



**APLICACIÓN DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS
VIBRACIONALES AL ESTUDIO DE LA
EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS
PROCEDENTES DE SUBPRODUCTOS ENOLÓGICOS**

Berta Baca Bocanegra

La tesis titulada “*Aplicación de técnicas espectroscópicas vibracionales al estudio de la extractabilidad de compuestos fenólicos procedentes de subproductos enológicos*”, presentada por la Lda. **D^a. Berta Baca Bocanegra** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla), bajo la dirección de los Doctores **D. Francisco José Heredia Mira**, Catedrático de la Universidad de Sevilla y **D. José Miguel Hernández Hierro**, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad de Sevilla. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, autorizan su presentación

En Sevilla, a 31 de octubre de 2018.



Fdo. Francisco José Heredia Mira



Fdo. Berta Baca Bocanegra



Fdo. José Miguel Hernández Hierro

Directores de la Tesis

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo institucional de la Universidad de Sevilla mediante un Contrato Predoctoral PIF-2014 (V Plan Propio de Investigación - Convocatoria II.2) y con la ayuda para la realización de una estancia breve en el extranjero para el año 2017 (V Plan Propio de Investigación), gracias a la cual ha sido posible optar a la Mención Internacional del Título de Doctor. El trabajo se ha desarrollado en el ámbito del proyecto I+D+i del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España: “Evaluación de estrategias tecnológicas adaptativas para vinificación en condiciones de cambio climático” (AGL2014-58486-C2-2), del que el doctor Francisco José Heredia Mira es el investigador principal

ÍNDICE



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	9
1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL	11
2. UVA Y VINIFICACIÓN.....	15
2.1. Morfología y estructura de la uva.....	15
2.2. Composición fenólica de la uva	16
2.2.1. Flavonoides	16
2.2.2. No flavonoides.....	19
2.3. Extractabilidad de los compuestos fenólicos de la uva.....	19
2.4. Vino tinto: composición y elaboración	21
3. MADERA DE ROBLE.....	23
3.1. El género <i>Quercus</i> . Clasificación y distribución geográfica	23
3.2. Composición química de la madera de roble	23
3.2.1. Compuestos volátiles.....	24
3.2.2. Compuestos fenólicos.....	25
3.3. Importancia de la madera de roble en el sector enológico.....	26
4. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	29
4.1. Espectrofotometría de absorción en la región ultravioleta–visible.....	31
4.2. Espectroscopía de infrarrojo	32
4.2.1. Análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano	33
4.2.2. Espectroscopía en el infrarrojo mediante transformada de Fourier	36

4.3. Espectroscopía Raman.....	36
4.4. Espectroscopía Portátil	38
5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	41
6. COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO	45
7. .CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA	49
8. QUIMIOMETRÍA	51
8.1. Pretratamientos espectrales.....	51
8.2. Análisis cualitativos utilizados	54
8.2.1. Análisis discriminante lineal (LDA).....	54
8.2.2. Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales (DPLS) 56	
8.2.3. Agrupamiento mediante el algoritmo de K-medias	57
8.2.4. Análisis de componentes principales (PCA)	57
8.3. Análisis cuantitativos utilizados	60
8.3.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS).....	60
OBJETIVOS GENERALES	65
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. MUESTRAS	73
1.1. Uva.....	73
1.2. Vino tinto.....	74
1.3. Madera de roble, subproducto de tonelería	75
2. TECNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	77
2.1. Análisis de imagen hiperespectral.....	77

2.1.1.	<i>Material y equipos</i>	77
2.1.2.	<i>Adquisición de imágenes hiperespectrales</i>	77
2.1.3.	<i>Segmentación de las imágenes hiperespectrales</i>	78
2.2.	Espectroscopía portátil	79
2.2.1.	<i>Material y equipos</i>	79
2.2.2.	<i>Adquisición de datos espectrales</i>	80
2.3.	Espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR–FTIR)	82
2.3.1.	<i>Material y equipos</i>	82
2.3.2.	<i>Medidas ATR–FTIR</i>	82
2.3.3.	<i>Medidas de imágenes ATR-FTIR</i>	83
2.4.	Espectroscopía Raman	83
2.4.1.	<i>Material y equipos</i>	83
2.4.2.	<i>Medidas Raman</i>	84
3.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	85
3.1.1.	<i>Material y equipos</i>	85
3.1.2.	<i>Medidas de microscopía</i>	85
4.	MEDIDAS DE COLOR POR COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO. ESPACIO CIELAB	87
4.1.1.	<i>Material y reactivos</i>	87
4.1.2.	<i>Medida del color</i>	87
5.	ANÁLISIS QUÍMICO	89
5.1.	Composición fenólica	89
5.1.1.	<i>Material y reactivos</i>	89
5.1.2.	<i>Extracciones</i>	90
5.1.3.	<i>Contenido en fenoles totales</i>	91
5.1.4.	<i>Contenido en flavanoles totales</i>	91
5.1.5.	<i>Determinación del perfil antocianico</i>	92

5.1.6. Determinación de elagitaninos	92
6. QUIMIOMETRÍA.....	95
6.1. Análisis de componentes principales (PCA).....	95
6.2. Regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS)	96
6.2.1. Aplicación de los modelos desarrollados.....	96
6.3. Análisis de la varianza (ANOVA)	97
6.4. Agrupamiento mediante el algoritmo de k-medias	97
6.5. Análisis Discriminante Lineal (LDA)	98
6.6. Análisis discriminante basado en la regresión por mínimos cuadrados parciales (DPLS)	98
6.7. Índice de similitud de Pearson	98
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
CAPÍTULO 1: INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE CHIPS DE MADERA DE ROBLE EN LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANOS PROCEDENTES DE HOLLEJO DE UVA CON BAJO CONTENIDO ANTOCIÁNICO EXTRAÍBLE.....	103
1. Antecedentes	103
2. Objetivo.....	104
3. Parte experimental	104
4. Conclusiones	106
• <i>Publicación: “Influence of oak wood chips-grape mix maceration on the extraction of anthocyanins from low-extractable anthocyanin content red grapes”</i>	<i>107</i>

CAPÍTULO 2: ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO Y LA EXTRACTABILIDAD DE FENOLES TOTALES Y FLAVANOLES EN SEMILLAS DE UVA MEDIANTE ANALISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL EN EL INFRARROJO CERCANO 113

1. Antecedentes	113
2. Objetivo.....	114
3. Parte Experimental	114
4. Conclusiones	117
• <i>Publicación: “Estimation of total phenols, flavanols and extractability of phenolic compounds in grape seeds using vibrational spectroscopy and chemometric tools”</i>	119

CAPÍTULO 3: APLICACIÓN DEL ANALISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL EN EL INFRARROJO CERCANO A LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO EXTRAIBLE DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN SUBPRODUCTOS DE TONELERÍA 131

1. Antecedentes	131
2. Objetivo.....	132
3. Parte experimental	132
4. Conclusiones	134
• <i>Publicación: “Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage byproduct by near infrared hyperspectral imaging”</i>	135

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE VIABILIDAD DEL USO DE UN DISPOSITIVO PORTÁTIL DE ESPECTROSCOPIA NIR PARA LA ESTIMACIÓN “IN SITU” DEL CONTENIDO POLIFENÓLICO EXTRAÍBLE EN HOLLEJOS DE UVA TINTA 143

1. Antecedentes	143
2. Objetivos	144

3. Parte Experimental	144
4. Conclusiones	146
• <i>Publicación: “Feasibility study on the use of a portable micro near infrared spectroscopy device for the “in vineyard” screening of extractable polyphenols in red grape skins”</i>	<i>149</i>

CAPÍTULO 5: APLICACIÓN DE TECNOLOGÍA PORTÁTIL MICRO-NIRS AL ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA EXTRAÍBLE DE SUBPRODUCTOS DE TONELERÍA 157

1. Antecedentes	157
2. Objetivo	158
3. Parte experimental	158
4. Conclusiones	159
• <i>Manuscrito: “Screening of wine extractable total phenolic and ellagitannin contents in revalorized cooperage byproducts: evaluation by Micro-NIRS technology”.</i>	<i>161</i>

CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN SUBPRODUCTOS DE TONELERÍA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO 195

1. Antecedentes	195
2. Objetivos	196
3. Parte experimental	196
4. Conclusiones	199
• <i>Manuscrito: “On the use of vibrational spectroscopy and scanning electron microscopy to study phenolic extractability of cooperage byproducts in wine”</i>	<i>201</i>

**CAPÍTULO 7: EFECTO DE LA ADICIÓN POST
FERMENTATIVA DE VIRUTA DE ROBLE, SUBPRODUCTO DE
TONELERÍA, EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y LA CALIDAD
CROMÁTICA DE VINOS TINTOS..... 239**

- 1. Antecedentes 239**
- 2. Objetivo 240**
- 3. Parte experimental 240**
- 4. Conclusiones 244**
 - *Manuscrito: “Valorization of American barrel-shoot wastes: effect of post fermentative addition and readdition on phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines” 245*

CONCLUSIONES GENERALES 271

REFERENCIAS 277

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La estructura de esta memoria sigue la modalidad “Conjunto de Trabajos”, recogida en el Artículo 9 de la Normativa Reguladora de Tesis Doctoral de la Universidad de Sevilla (Bous nº 3 de 23 de mayo de 2012), a partir de la siguiente producción científica:

Artículos:

Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Heredia Mira, Francisco José; Hernández Hierro, José Miguel: *Influence of oak wood chips-grape mix maceration on the extraction of anthocyanins from low-extractable anthocyanin content red grapes*. En: *European Food Research and Technology* 2018. Vol. 244. Pág. 729–734, ISSN 1438-2377. Factor de impacto: 1.919. Segundo cuartil.

Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Heredia Mira, Francisco José; Hernández Hierro, José Miguel: *Estimation of total phenols, flavanols and extractability of phenolic compounds in grape seeds using vibrational spectroscopy and chemometric tools*. En: *Sensors* 2018. Vol. 18. Pág. 2426-2438, ISSN 1424-8220. Factor de impacto: 2.475. Segundo cuartil.

Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José: *Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage byproduct by near infrared hyperspectral imaging*. En: *Food Chemistry* 2018. Vol. 244. Pág. 206–212, ISSN 0308-8146. Factor de impacto: 4.946. Primer cuartil.

Baca Bocanegra, Berta; Hernández Hierro, José Miguel; Nogales Bueno, Julio; Heredia Mira, Francisco José: *Feasibility study on the use of a portable micro near infrared spectroscopy device for the “in vineyard” screening of extractable polyphenols in red grape skins*. En: *Talanta*, 2019. Vol. 192. Pág. 353–359, ISSN 0039-9140. Factor de impacto: 4.244. Primer cuartil.

Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; García Estévez, Ignacio; Escribano Bailón, María Teresa; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José: *Screening of wine extractable total phenolic and ellagitannin contents in revalorized cooperage byproducts: evaluation by Micro-NIRS technology*. Enviado a: *Food and Bioprocess Technology* (en revisión). ISSN 1935-5130. Factor de impacto: 2.998. Primer cuartil.

Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Gorey, Brian; Heredia Mira, Francisco José; Byrne, Hugh J.; Hernández Hierro, José Miguel: *On the use of vibrational spectroscopy and scanning electron microscopy to study phenolic extractability of cooperage byproducts in wine*. Enviado a *Food Chemistry* (en revisión), ISSN 0308-8146. Factor de impacto: 4.946. Primer cuartil.

Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José: *Valorization of American barrel-shoot wastes: effect of post fermentative addition and readdition on phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines*. Enviado a: Food Chemistry (en revisión). ISSN 0308-8146. Factor de impacto: 4.946. Primer cuartil.

RESUMEN



RESUMEN

Las características de la uva en el momento de la vendimia condicionan en gran medida la calidad del vino elaborado a partir de ellas. En regiones de clima cálido, las altas temperaturas ambientales, acentuadas en las últimas décadas por los efectos del cambio climático, originan un desfase entre la madurez tecnológica de la uva, cada vez más temprana y la madurez fenólica, cada vez más tardía, que desencadena, entre otros, problemas de estabilidad cromática en el envejecimiento. Ante esta situación se pone de manifiesto la necesidad de implementar medidas de adaptación que permitan preservar la calidad de estos vinos. En este sentido, el aprovechamiento de subproductos de la industria vitivinícola ricos en compuestos fenólicos, como pueden ser las virutas de madera cruda de las tonelerías, añadidas en etapas iniciales de la vinificación, se presenta como una estrategia enológica, nueva y sostenible, para paliar los efectos del cambio climático en la calidad de los vinos tintos. Los compuestos fenólicos de la madera, que pasarán al vino durante el proceso de maceración, junto con los compuestos fenólicos procedentes de la uva, determinarán la composición fenólica del vino y condicionarán sus características cromáticas y organolépticas.

Tradicionalmente, la composición fenólica, y la facilidad de cesión de estos compuestos al vino desde diferentes matrices, se ha controlado por métodos de análisis fisicoquímicos que, en muchos casos, resultan complejos y tediosos. En las últimas décadas se han desarrollado técnicas espectroscópicas que permiten estimar de forma rápida, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente, distintos parámetros de interés enológico.

En este trabajo, inicialmente se ha evaluado el efecto que tiene la adición de chips de madera en la extracción de compuestos antociánicos del hollejo de uva tinta clasificada hiperspectralmente como uva con baja capacidad de cesión de dichos compuestos. Se ha comprobado que la adición de copigmentos provenientes de la madera, que contribuyen a mejorar el color del vino, no altera el equilibrio de extracción de antocianos del hollejo.

Se ha utilizado el análisis de imagen hiperspectral en la región del infrarrojo cercano y la regresión por mínimos cuadrados parciales (MPLS) para analizar de forma rápida el contenido total y el contenido extraíble de fenoles totales y flavanoles en semillas de uva tinta. De forma similar, se ha desarrollado un modelo MPLS para predecir el contenido fenólico extraíble en viruta cruda de roble.

Se ha evaluado la capacidad de la espectroscopía NIR portátil para estimar *in situ* de forma rápida el contenido fenólico extraíble del hollejo de uva y de la viruta cruda de roble. La influencia de las condiciones ambientales en el viñedo en el momento de la adquisición espectral pueden condicionar los resultados obtenidos para los hollejos, de forma que los modelos presentan errores que comprometen su aplicación con fines predictivos. Sin embargo, en virutas de roble, los

modelos propuestos para la predicción del contenido extraíble de fenoles totales y de elagitaninos ofrecen resultados satisfactorios para todos los parámetros evaluados.

Así mismo, utilizando espectroscopía en el infrarrojo medio por transformada de Fourier y espectroscopía Raman se han caracterizado muestras de viruta cruda de madera y se han relacionado las características espectrales con la facilidad de extracción de compuestos fenólicos. De esta forma, se ha podido confirmar la relación existente entre la extractabilidad de compuestos fenólicos en viruta de madera y la composición y distribución de los componentes de su pared celular. La microscopía electrónica de barrido (SEM) aporta información topográfica complementaria que respalda la relación entre la estructura de la madera y los niveles de extractabilidad fenólica.

Por último, se ha evaluado objetivamente el potencial enológico de la viruta cruda de roble, subproducto de tonelería. Para ello se ha determinado, en una situación real de vinificación en tinto, la influencia de la adición post-fermentativa de virutas en la composición fenólica y la calidad cromática de vinos tintos de variedad Syrah. Los resultados obtenidos demuestran que la adición pos-fermentativa de viruta de madera cruda representa un procedimiento útil para la elaboración de vinos tintos en clima cálido, ya que produce una mejora tanto de la composición fenólica como de la calidad y estabilidad cromática.

ABSTRACT

Wine quality mainly depends on the characteristics of harvested grapes. In warm climate regions, the production of quality red wines are facing serious problems related to high temperatures, more accused during last decades due to the effect of the climatic changes. Usually, there is a gap between saccharimetric and phenolic maturity, which causes, among others, chromatic stability problems during aging. Taking it into account, the need to implement adaptative strategies in order to preserve wine quality is evident. Utilization of byproducts from the wine industry such as raw oak shavings, as cooperage byproduct, represents a new and sustainable oenological strategy to minimize the effects of the climate change on the quality of red wines. Phenolic compounds of wood, which will release to wine during the maceration stage, together with phenolic compounds from grapes, will determine wine phenolic composition and its chromatic and organoleptic characteristics.

Traditionally, phenolic composition and phenolic compounds extractability are determined by physical and chemical analyses, which are usually time consuming. During the past several decades, spectroscopic techniques have grown significantly, as technology improved. This growth has allowed developing fast, non-destructive and green chemistry methods for the screening of different parameters of value for oenology.

The effect that copigments coming from oak wood chips presents on the anthocyanin extraction from red grape skins, previously classified by near infrared hyperspectral image analysis as low-extractable anthocyanin grapes, has been initially evaluated. In this work it has been proven that the addition of copigments coming from oak wood chips, that improve or stabilize wine colour, has not reduce the amount of extracted anthocyanins from red grape skin.

Near infrared hyperspectral imaging and modified partial least squares regression (MPLS) have been applied to analyse, in a fast way, total and extractable content of total phenols and flavanols in red grape seeds. Similarly, a MPLS model has been developed in order to estimate extractable phenolic content in oak wood shavings.

The capability of portable NIR spectroscopy to predict quickly and *in situ* extractable phenolic content in grape skins has been evaluated. Vineyard environmental conditions maybe play a critical role on its use and influence on the obtained data, so that the developed models present errors that compromise their application for predictive purposes. However, in oak wood shavings, the models proposed for the prediction of extractable content of total phenols and ellagitannins offer satisfactory results for all parameters evaluated.

Likewise, Fourier transform infrared and Raman spectroscopy have shown to be useful to characterize oak wood shavings and to relate the more important spectral features to phenolic extractability. In this way, it has been confirmed the relationship between the extractability of

phenolic compounds in wood shavings and the composition and distribution of their cell wall compounds. Scanning electron microscopy (SEM) provided valuable topographic information that supports the relationship between the structure of wood and phenolic extractability levels.

Finally, the oenological potential of raw oak wood shavings, as cooperage by-product, has been evaluated. For this purpose, it has been determined, in a real red vinification situation, the effect of post-fermentative addition of oak shavings on phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines. Based on the obtained results, post-fermentative addition of raw wood shavings could be considered a useful winemaking procedure for the production of high quality red wines in warm climate since it improves the phenolic composition as well as the quality and stability of colour.

INTRODUCCIÓN



1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

Los efectos del cambio climático sobre el medio ambiente son cada vez más evidentes, lo que ha provocado que se tienda a buscar y a implementar estrategias de adaptación a dicho escenario. Atendiendo a los datos de temperatura y precipitaciones, se puede deducir que la vitivinicultura española, principalmente la de las regiones más cálidas como Andalucía, será especialmente sensible a estos efectos, afectando a la productividad de la vid y a la calidad del vino (Bergqvist, Dokoozlian, y Ebisuda, 2001; Malheiro, Santos, Fraga, y Pinto, 2010; Mira de Orduña, 2010).

Con primaveras secas y veranos cálidos, el periodo de maduración de la uva disminuye. Especialmente en las uvas tintas, la pulpa madura con rapidez, alcanzando altas concentraciones de azúcar mientras que la acumulación de compuestos fenólicos en las semillas y los hollejos se ve afectada negativamente por la aceleración del periodo de maduración (Mori, Sugaya, y Gemma, 2005) produciéndose, por tanto, un desfase entre la madurez tecnológica y fenólica de la uva que da lugar a deficiencias en el color de los vinos elaborados con dichas bayas (Gordillo, Rodríguez-Pulido, Mateus, Escudero-Gilete, Gonzalez-Miret, Heredia, et al., 2012). Además del contenido en azúcar, la madurez tecnológica considera la acidez total y el pH que ayudan a controlar el color y calidad de este. Por su parte, la importancia de la madurez fenólica se debe a que los compuestos fenólicos presentes en las uvas pueden pasar al vino durante la maceración y son los responsables del color del vino y de su capacidad de envejecimiento (Waterhouse, 2002).

A pesar de la importancia de la madurez fenólica de la uva en la calidad del vino, la elección del momento de vendimia se ha llevado a cabo, tradicionalmente, considerando criterios de madurez tecnológica y no fenólica, elaborándose, en muchos casos, vinos a partir de uvas con un contenido fenólico insuficiente. En estas condiciones, las reacciones de copigmentación, que contribuyen a la estabilización del color, se ven obstaculizadas por el déficit de pigmentos y copigmentos (Boulton, 2001; Escribano-Bailon y Santos-Buelga, 2012; Trouillas, Sancho-Garcia, De Freitas, Gierschner, Otyepka, y Dangles, 2016).

Estos problemas son bien conocidos en el sector enológico y han llevado a considerar la aplicación de técnicas que permitan la obtención de vinos con características sensoriales adecuadas a pesar de partir de una materia prima que no sea la óptima. Así, se han aplicado técnicas de elaboración novedosas como son la maceración prefermentativa (Gómez-Míguez, González-Miret, y Heredia, 2007; Heredia, Escudero-Gilete, Hernanz, Gordillo, Melendez-Martinez, Vicario, et al., 2010), o la adición externa de copigmentos en la vinificación, bien como extractos, o bien a partir de fuentes naturales que los contengan como chips de madera de roble tostada (Cejudo-Bastante, Rivero-Granados, y Heredia, 2017; Gordillo, Cejudo-Bastante,

Rodriguez-Pulido, Gonzalez-Miret, y Heredia, 2013). La madera es una fuente natural de fenoles que, utilizada en las fases iniciales de la vinificación de vino tinto, puede modificar las condiciones redox del medio y afectar a sus características organolépticas, y concretamente, al color, gracias a los fenómenos de copigmentación (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, y Dubourdieu, 2006; Zamora, 2003). En este sentido, la adición de viruta cruda (no tostada) de madera de roble generada como subproducto de la elaboración de barricas, puede constituir una estrategia enológica, nueva y sostenible, para paliar el problema de inestabilidad de color de los vinos tintos. Esta técnica, además de representar una interesante alternativa tecnológica a la vinificación tradicional, supone una revalorización del subproducto mayoritario de la industria tonelera. Se estima que solamente en las dos tonelerías más importantes de la D.O.C. Condado de Huelva se generan cerca de 650 toneladas por año de subproductos susceptibles de ser utilizados con estos fines.

La relación entre la madera de roble y el vino es muy antigua. El roble se utiliza fundamentalmente en el sector enológico para la elaboración de barricas donde se almacena el vino durante la crianza (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Asimismo, desde que la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) aprobó la adición de fragmentos de madera al vino para producir una crianza acelerada (CE_1507/2006, 2006; OENO_3/2005 y OENO_430/2010, 2013), ésta se ha convertido en una práctica muy extendida (Hernández-Orte, Franco, Huerta, García, Cabellos, Suberviola, et al., 2014; Jourdes, Michel, Saucier, Quideau, y Teissedre, 2011). Sin embargo, a pesar de que la madera cruda se encuentra recogida como apta para su uso en prácticas enológicas, su uso es muy poco frecuente, en contraste con la frecuencia de uso de la madera tostada.

La aptitud enológica de la uva y el potencial fenólico de la madera utilizada en vinificación son aspectos fundamentales para la calidad del vino. Las características y propiedades del vino dependen en gran medida de su contenido fenólico. Por tanto, es importante conocer no solo el contenido fenólico de la uva y de los subproductos utilizados como fuente natural de copigmentos en el proceso de vinificación sino, además, la facilidad con la que estos compuestos fenólicos son cedidos al vino.

Habitualmente, la determinación del contenido extraíble y la extractabilidad de los compuestos fenólicos se lleva a cabo mediante análisis espectrofotométricos y/o cromatográficos que requiere una extracción previa de estos compuestos por medio de maceraciones de las diferentes matrices en disoluciones hidroalcohólicas. Estos métodos son largos, laboriosos y/o destructivos. Como alternativa a estos métodos de análisis tradicionales, las técnicas de espectroscopía vibracional representan un procedimiento analítico rápido, no destructivo, respetuoso con el medio ambiente y fácilmente automatizable, que goza de prestigio para la estimación, con adecuada precisión, de parámetros de interés en el sector agroalimentario y concretamente en el sector vitivinícola (Baca-

Bocanegra, Nogales-Bueno, Rodríguez-Pulido, González-Miret, Hernández-Hierro, y Heredia, 2016; Nogales-Bueno, Rodríguez-Pulido, Baca-Bocanegra, González-Miret, Heredia, y Hernández-Hierro, 2016). En los últimos años, los avances tecnológicos están propiciando el afloramiento de nuevas tendencias hacia el desarrollo de una nueva generación de espectrómetros portátiles. Estos sistemas incorporan la precisión analítica necesaria para la identificación y cuantificación química con una resolución espectral equivalente a los instrumentos de mesa, lo que permite flexibilidad para el análisis en campo ya que el equipo puede transportarse fácilmente, evitando por tanto, el transporte de muestras y los inconvenientes que ello conlleva.

2. UVA Y VINIFICACIÓN

2.1. Morfología y estructura de la uva

La uva (*Vitis vinifera* L.) es una baya carnosa de forma redondeada. A pesar de que se consume en fresco, su uso principal es la elaboración de vino. El hollejo, la pulpa y las semillas constituyen la estructura fundamental de la uva.

El hollejo es la parte más externa del grano de uva. Está formado por tres capas bien diferenciadas, desde el exterior al interior: cutícula, epidermis e hipodermis. En estas dos últimas capas de células se ubican la mayor parte de los compuestos fenólicos y sustancias aromáticas que contiene la uva (Hidalgo Togados, 2010; Pinelo, Arnous, y Meyer, 2006). La cutícula está recubierta de una capa cerosa llamada pruina, que le confiere a la uva un aspecto exterior mate o pulverulento. La riqueza en polifenoles del hollejo es muy variable, dependiendo de la variedad de uva y de su grado de maduración. Es en el hollejo donde se encuentran los compuestos que caracterizan a un vino, a pesar de que estos se encuentran en pequeñas cantidades en relación a los de la pulpa. Estos compuestos son los responsables de la astringencia del vino y juegan un papel muy importante en su conservación y crianza. Gran parte de estos fenoles son coloreados y son, por tanto, responsables directos del color del vino y su estabilidad (Waterhouse, 2002).

La pulpa es la parte más voluminosa del grano de uva. Es un tejido de acumulación de las sustancias sintetizadas por la vid y excedentarias de las no utilizadas por las semillas. El agua es el compuesto mayoritario de la pulpa y tiene la misión de hacer de solvente del resto de compuestos de la uva. Los azúcares son los siguientes compuestos más abundantes del mosto, siendo los mayoritarios la glucosa y la fructosa. Los ácidos orgánicos junto con los azúcares, son los compuestos más importantes que tiene la pulpa, conteniendo en plena madurez del racimo una acidez del orden de 3 a 7 g L⁻¹. Los polifenoles que contiene la pulpa son fundamentalmente de tipo no flavonoides, siendo los ácidos cinámicos y benzoicos los más abundantes. No suelen encontrarse en la pulpa polifenoles de tipo flavonoide excepto trazas de flavanoles muy poco polimerizados y en las variedades tintoreras de pulpa coloreada, antocianos responsables del color rojo característico (Hidalgo Togados, 2010).

Las semillas constituyen los elementos de la vid encargados de perpetuar la especie. Las semillas representan respecto del peso del grano de uva, hasta un máximo del 6%. Los principales componentes de las semillas de uva son: agua, carbohidratos, aceites, compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, minerales, y ácidos grasos. Siendo los aceites y los compuestos fenólicos los de mayor interés debido a sus propiedades beneficiosas para la salud (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Los compuestos fenólicos más importantes en la semilla de uva son los

flavanoles, apareciendo tanto en forma de monómeros como de oligómeros y polímeros compuestos de distintas subunidades monoméricas (Ristic y Iland, 2005).

2.2. Composición fenólica de la uva

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de sustancias químicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. En la uva, estos compuestos se encuentran repartidos por todo el fruto, tanto en semillas como hollejos y pulpa, y pasarán directamente al vino durante el proceso de maceración (Waterhouse, 2002).

Existen más de 8000 estructuras fenólicas diferentes, que pueden variar desde una molécula fenólica sencilla a la de un polímero de alto peso molecular complejo (Balasundram, Sundram, y Samman, 2006). La estructura básica de todas ellas se caracteriza por un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo, y pueden clasificarse en base al número y disposición de los átomos de carbono. Los principales compuestos fenólicos encontrados en la uva y sus derivados se pueden agrupar en flavonoides y no flavonoides (Cheynier, Moutounet, y Sarni-Machado, 2003).

2.2.1. Flavonoides

Los flavonoides poseen un esqueleto básico de 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆), que en su nivel más simple consta de dos anillos fenilo (anillos A y B) conectados por un esqueleto de tres átomos de carbono que, generalmente, se encuentra formando un anillo heterocíclico (anillo C) (Figura 1)

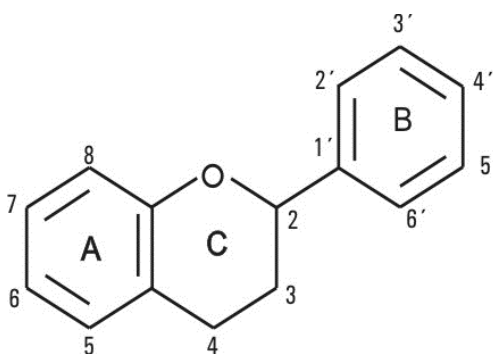


Figura 1. Estructura base de los flavonoides

Las principales clases de flavonoides son flavanoles, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, chalconas y antocianos. Esta clasificación se realiza en función del grado de insaturación y sustituyentes del anillo C.

❖ Flavanoles

Los flavan-3-oles son los flavonoides más abundantes en la uva. Los principales flavanoles monómeros de la uva son la (+) catequina y su isómero *cis* (-)-epicatequina, pudiendo encontrarse este último en forma de éster gálico (galato de epicatequina) (Cheynier, et al., 2003). No obstante, los monómeros representan tan solo una pequeña proporción, ya que la mayor parte de ellos están en forma de polímeros que se conocen como taninos condensados.

Estos compuestos se localizan principalmente en las semillas, y también en cierta cantidad en hollejos, incluso se han detectado trazas de monómeros y dímeros en la pulpa. Los contenidos de flavanoles en las semillas son siempre superiores a los de los hollejos, ya se trate de monómeros, oligómeros o polímeros. Estos compuestos están implicados en importantes sensaciones organolépticas como el color vía pigmentación con los antocianos, la astringencia y el amargor del vino (Hufnagel y Hofmann, 2008a).

❖ Flavonoles

Los flavonoles constituyen una familia de compuestos con colores de blanco a amarillo cuya principal función es proteger al fruto de la radiación solar. Los cuatro principales flavonoles que pueden encontrarse en uva son kaempferol, quercetina, miricetina e isoramnetol. Se pueden encontrar en forma glucosilada (más abundante), pero se encuentran igualmente cantidades importantes de glucurónidos. Otros azúcares a los que pueden aparecer unidos los flavonoles son galactosa, xilosa y arabinosa (Cheynier, et al., 2003).

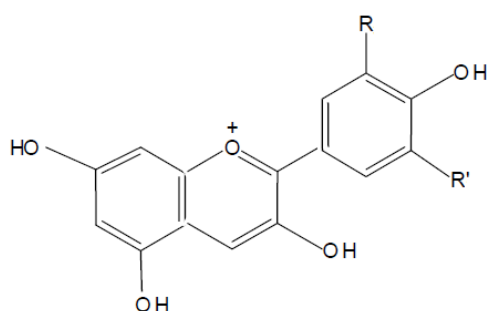
Aparecen tanto en variedades blancas como en tintas, con concentraciones totales similares aunque si atendemos a los compuestos individuales las cantidades varían dependiendo de que se trate de uva blanca o tinta. Estos compuestos se encuentran principalmente en el hollejo de la uva aunque también han sido detectados en pulpa (Hernandez-Jimenez, Gomez-Plaza, Martinez-Cutillas, y Kennedy, 2009; Kammerer, Claus, Carle, y Schieber, 2004). Los flavonoles tienen cierta influencia en el amargor de los vinos (Preys, Mazerolles, Courcoux, Samson, Fischer, Hanafi, et al., 2006) y además pueden influir en la sensación de astringencia (Hufnagel, et al., 2008a; Hufnagel y Hofmann, 2008b). Por otro lado, contribuyen al color del vino tinto y a su estabilización ya que se comportan como buenos copigmentos de los antocianos (Boulton, 2001; Gómez-Míguez, González-Manzano, Escribano-Bailón, Heredia, y Santos-Buelga, 2006).

❖ Antocianos

Los antocianos son una familia de compuestos de naturaleza flavonoide que se localizan en el hollejo y, para las variedades tintoreras, también en la pulpa. Estos compuestos son muy importantes en las uvas y en el vino tinto tanto cuantitativa como cualitativamente, ya que se

encuentran en cantidades bastante elevadas, siendo los responsables del color característico de estos productos (Crozier, Clifford, y Ashihara, 2006).

Su estructura consta de un esqueleto con dos anillos bencénicos (A y B) unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado, insaturado y catiónico, denominado catión flavilio (antocianidina). De todas las antocianidinas monoméricas que han sido descritas, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina están ampliamente distribuidas en la uva y por tanto, en el vino. Las diferencias entre ellas se limitan a los distintos niveles de hidroxilación y metilación del catión flavilio (Figura 2). Además, los distintos azúcares y ácidos que esterifican a las antocianidinas y la posición donde aparece el enlace glucosídico permiten distinguir las diferentes familias de antocianos. La glucosa es el principal azúcar que aparece unido a las antocianidinas en uva, comúnmente en la posición 3 del anillo C. Los principales ácidos que esterifican el azúcar son el ácido acético, el ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico. Teniendo esto en cuenta, los antocianos presentes en uva pueden agruparse según se encuentren acilados o no acilados y dentro de los acilados, según cual sea el ácido que esterifique al azúcar (acetatos, cumaratos o cafeoatos) (Cheynier, et al., 2003; Zamora, 2003).



Antocianidina	R	R'
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 2. Estructura de las antocianidinas presentes en uva

El color de los antocianos puede verse afectado por la existencia de procesos de copigmentación que son posibles gracias a la estructura plana de los antocianos y de los compuestos con los que interacciona mediante fuerzas débiles, denominados copigmentos (Boulton, 2001; Escribano-Bailon, et al., 2012; Trouillas, et al., 2016). Los ácidos fenólicos, los flavonoles y los flavanoles pueden actuar como copigmentos. Los antocianos están involucrados además en gran cantidad de reacciones a partir de las cuales se generan otros pigmentos derivados que, debido principalmente a su mayor estabilidad química, pueden ser responsables de ciertas tonalidades del color en los vinos tintos envejecidos según el tipo y la cantidad de pigmentos formados.

2.2.2. *No flavonoides*

Los compuestos no flavonoides son el resto de compuestos fenólicos que no comparten dicha estructura común. Este grupo incluye dos grandes familias: los ácidos fenólicos, divididos en ácidos hidroxibenzóicos y ácidos hidroxicinámicos, y los estilbenos.

❖ *Ácidos fenólicos*

Los ácidos hidroxicinámicos son los ácidos fenólicos más comunes en la uva, se encuentran en las vacuolas de las células del hollejo y la pulpa, siendo el contenido en el hollejo más elevado que en la pulpa. Estos ácidos se pueden encontrar tanto libres como esterificados con otros compuestos tanto de naturaleza flavonoide como no flavonoide. Los más importantes son los ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico, así como sus ésteres tartáricos, denominados ácidos caftárico, fertárico y cutárico, respectivamente. La forma natural es la *trans* (*E*) pero los isómeros *cis* (*Z*) también existen aunque en pequeña cantidad. Durante el proceso de vinificación, estos ésteres pueden hidrolizarse de manera que en el vino coexisten las formas libres y esterificadas (Crozier, et al., 2006).

En cuanto a ácidos benzoicos, la uva contiene principalmente ácido gálico, presente en forma de éster de flavanoles. Este ácido puede alcanzar concentraciones superiores a 100 mg L⁻¹ en vino tinto (Cheynier, et al., 2003).

Los ácidos fenólicos no presentan una influencia demasiado relevante en el sabor ni en el aroma de los vinos, pero sí son precursores de compuestos fenólicos volátiles que pueden afectar a estas propiedades organolépticas. Además, estos compuestos pueden afectar al color del vino ya que han demostrado ser capaces de reaccionar con los antocianos.

❖ *Estilbenos*

Bajo el punto de vista del color y de otras propiedades organolépticas, los estilbenos no presentan importancia destacable. No obstante, últimamente han cobrado una gran relevancia científica debido a los efectos beneficiosos que el resveratrol y otros compuestos parecen ejercer sobre la salud humana.

2.3. Extractabilidad de los compuestos fenólicos de la uva

Las propiedades y la calidad del vino dependen no solo de la composición fenólica cualitativa y cuantitativa de las uvas utilizadas para su elaboración sino también de la facilidad con que estos compuestos son cedidos al vino durante el proceso de vinificación.

El estado de maduración de la uva en el momento de la vendimia va a influir de manera importante en este proceso ya que la liberación de los compuestos fenólicos de las partes sólidas

de las uvas (semillas y hollejos) requiere la degradación de la pared celular. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los hollejos, la extractabilidad fenólica aumenta con la madurez, mientras que en las semillas disminuye (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

En el hollejo de uva, la extracción de compuestos fenólicos aumenta a medida que aumenta el contenido de sólidos solubles en el mosto de uva, es decir, con el grado de madurez de la uva (Fournand, Vicens, Sidhoum, Souquet, Moutounet, y Cheynier, 2006; Torchio, Cagnasso, Gerbi, y Rolle, 2010; Zouid, Siret, Jourjon, Mehinagic, y Rolle, 2013). Además, se ha demostrado que diferentes etapas de la maduración de la uva (premaduración, maduración y sobremaduración) afectan a la cantidad de fenoles extraíbles de la misma manera que lo hacen sobre el total de sólidos solubles (Canals, Llaudy, Valls, Canals, y Zamora, 2005; Fournand, et al., 2006; Hernandez-Hierro, Quijada-Morin, Rivas-Gonzalo, y Escribano-Bailon, 2012) como consecuencia de las diferencias en la composición polisacáridica de la pared celular del hollejo y de la diferente metilación de las pectinas que forman la misma en las diferentes etapas de maduración de la uva. Este parámetro de extracción de compuestos fenólicos también se ve afectado por las condiciones de maceración de la uva (González-Manzano, Rivas-Gonzalo, y Santos-Buelga, 2004). En lo que respecta a las propiedades físicas del hollejo, el espesor de dicha pared o la densidad de la misma deben ser también consideradas en la evaluación de la extracción de los compuestos fenólicos de la uva (Ortega-Regules, Romero-Cascales, Ros-García, López-Roca, y Gómez-Plaza, 2006).

Por lo que respecta a la semilla de uva, la extractabilidad disminuye durante la maduración, de aproximadamente el 25% en las primeras etapas a aproximadamente el 5% en la última (Rodríguez-Pulido, Hernández-Hierro, Nogales-Bueno, Gordillo, Gonzalez-Miret, y Heredia, 2014). Este fenómeno podría estar relacionado con la presencia del tegumento intermedio, que es impermeable y muy duro cuando las semillas maduran y lignifican, y podría evitar la extracción (Cadot, Minana-Castello, y Chevalier, 2006). Por otro lado, cambios en la estructura polisacáridica de la pared celular podría afectar la solubilidad de los flavonoides (Bautista-Ortín, Jiménez-Pascual, Busse-Valverde, López-Roca, Ros-García, y Gómez-Plaza, 2013). Además, la maceración enzimática, normalmente utilizada en el proceso de elaboración del vino para degradar la pared celular del hollejo con el fin de aumentar el color, también puede favorecer la extracción de flavonoides procedentes de las semillas debido a la degradación de la pared celular de las semillas, especialmente si están inmaduras y muestran baja lignificación.

2.4. Vino tinto: composición y elaboración (Asselin y Delteil, 2003; Carbonneau, Champagnol, Deloire, y Sevilla, 2003; Razungles, Blouin, Boulet, Escudier, Feuillat, Flanzy, et al., 2003; Ribéreau-Gayon, et al., 2006; Zamora, 2003)

El vino tinto se define como el producto resultante de la fermentación alcohólica del mosto obtenido a partir de la uva tinta. Durante la vinificación se forman diferentes sustancias que, junto con las presentes originariamente en la uva, y en función de la tecnología empleada para la elaboración y envejecimiento del vino, determinan la composición del mismo. Entre los compuestos fenólicos presentes en el vino, poseen un especial interés los compuestos de estructura flavonoide, tanto por su contribución a las propiedades sensoriales del vino (color, sabor, astringencia y amargor) (Arnold, Noble, y Singleton, 1980) como por el posible efecto fisiológico que pueden tener consecuencia de su actividad antioxidante y captadora de radicales libres (Teissedre, Frankel, Waterhouse, Peleg, y German, 1996). Estos compuestos se encuentran principalmente en el hollejo y la semilla de la uva, desde donde son extraídos al medio líquido durante el proceso de vinificación.

Las etapas más importantes en la elaboración del vino tinto se detallan a continuación:

❖ Maceración y fermentación alcohólica

El proceso de maceración comprende desde el momento en que se llena la cuba con la uva hasta el descube del vino, esto es, antes, durante y después de la fermentación. A lo largo de estos procesos se produce la extracción de los compuestos procedentes de la uva al mosto a partir del que se generará el vino. Durante la maceración pre-fermentativa el medio es acuoso y se encuentra a una temperatura moderada, extrayéndose principalmente los antocianos y los flavanoles de la piel de la uva, así como parte de los polisacáridos. A continuación ocurre la fermentación alcohólica, durante la cual la glucosa es transformada por las levaduras presentes en etanol, convirtiendo el medio en hidroalcohólico. Este medio facilita la extracción de compuestos fenólicos del hollejo y permite la extracción de compuestos fenólicos presentes en la semilla. Además durante este periodo comienzan a darse algunas interacciones entre antocianos y flavanoles. Por último tiene lugar la maceración post-fermentativa, desde que finaliza la fermentación hasta el descube del vino. Durante esta etapa, continúa la extracción de taninos, principalmente desde la semilla de la uva.

❖ Fermentación maloláctica

Este proceso, esencial en los vinos tintos, se produce tras la fermentación alcohólica y en él intervienen las bacterias lácticas que, de manera natural, se encuentran en la uva. Su misión es transformar el ácido málico en ácido láctico, lo que, en cuanto a sabor se refiere, consigue la disminución de la acidez en el vino. El ácido láctico resulta más suave que el málico, por lo que tiene lugar un aumento de la untuosidad y los aromas en el vino, y se asegura una mayor

estabilidad biológica ya que, al desaparecer el ácido málico que sirve como nutriente a las bacterias lácticas, es difícil que éstas proliferen en el medio provocando riesgos biológicos. Además de la generación de ácido láctico, durante la fermentación maloláctica se liberan al medio diferentes sustancias que pueden afectar principalmente al aroma y al sabor del vino, tanto positiva como negativamente.

❖ Envejecimiento

El vino es un medio en constante evolución por lo que el envejecimiento se produce hasta el momento de su consumo. En condiciones idóneas, durante este tiempo el vino consigue una perfecta maduración, afinando sus características organolépticas. Durante el envejecimiento en barricas de roble, tienen lugar diversos procesos mediante los cuales el vino gana en complejidad y estabilidad. Por una parte la madera permite una entrada de oxígeno de manera moderada, vital para que se den las reacciones de polimerización y combinación entre antocianos y flavanoles que conllevan a la estabilización del color y a la modulación de la astringencia. Por otra parte, se produce la precipitación de parte de la materia colorante del vino, evitando así que aparezcan precipitados durante la permanencia del vino en botella. Además, como se detalla más adelante, el roble aporta gran cantidad de compuestos al vino: sustancias volátiles y compuestos fenólicos, tanto nativos de la madera como formados durante el secado y tostado de la misma, que mejoran el aroma y la calidad gustativa del vino. Las sustancias volátiles aportan aromas característicos al vino que solo se consiguen mediante el envejecimiento. Los compuestos fenólicos participan principalmente en el sabor, aunque algunos de ellos tienen también importancia en la evolución del vino y en las transformaciones que sufren los pigmentos responsables del color.

3. MADERA DE ROBLE

3.1. El género *Quercus*. Clasificación y distribución geográfica

El término roble hace referencia a las más de 150 especies de árboles que agrupa el género *Quercus*, perteneciente a la familia de las fagáceas. Son árboles de gran porte por lo general, aunque también se incluyen arbustos. Entre las diversas especies que componen este género, *Quercus alba* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. y *Quercus robur* L. son las tres especies con mayor relevancia en el sector enológico (Vivas, 2002).

La mayor parte de estas especies de alto valor enológico se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo de Europa, América del norte y América central, el sudeste asiático y en menor medida, en el norte de África y la región norte de Sudamérica. No obstante, las principales zonas productoras de las tres especies de roble de interés enológico son Francia y los Estados Unidos de América. En Francia se pueden encontrar tanto robles de la especie *Quercus petraea*, como de la especie *Quercus robur*. La especie *Quercus petraea* se cultiva principalmente en las regiones Centro de Francia, Borgoña y Vosges donde se adapta bien a los suelos arenosos y no requiere demasiada luminosidad. Mientras que la especie *Quercus robur* crece fundamentalmente en la zona de Limusin y requiere suelos fértiles y mucha más luminosidad. La especie *Quercus alba* procede de América del Norte siendo las principales áreas de producción los bosques de los estados de Virginia, Carolina del Norte, Tennessee, Kentucky, Missouri y Oregón (Vivas, 2002; Zamora, 2003). Por este motivo, tradicionalmente en tonelería se habla de roble francés o roble americano sin hacer distinción entre especies.

3.2. Composición química de la madera de roble

La madera de roble posee una amplia variabilidad en su composición química determinada por factores como la especie, el origen geográfico, las condiciones de cultivo o la edad de la madera (Mosedale, Puech, y Feuillat, 1999; Singleton, 1995). Se sabe que puede existir variabilidad entre individuos de la misma especie que crecen juntos en un mismo bosque, e incluso dentro de un mismo árbol (Chatonnet y Dubourdieu, 1998; Masson, Moutounet, y Puech, 1995; Mosedale, et al., 1999; Prida y Puech, 2006; Sauvageot y Feuillat, 1999).

Celulosa, hemicelulosa y lignina son los principales constituyentes de la pared celular de la madera de roble. Estos compuestos confieren a la madera sus características propiedades físico-mecánicas como la resistencia a la tracción y a la compresión. El resto de los componentes constituyen la llamada fracción extraíble, y pueden presentarse intercalados con los polímeros en la pared celular o como inclusiones en los lúmenes celulares. Estos compuestos contribuyen al

desarrollo de varias propiedades organolépticas de los vinos tratados con madera tales como el color, sabor y olor (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). De entre ellos los más abundantes son los elagitaninos, pero también se encuentran otros componentes de diversa naturaleza y estructura.

3.2.1. Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles procedentes de la madera de roble tostada, como el metilfurfural, el siringaldehído o el eugenol, son los principales responsables del aroma y sabor típicos de los vinos que han tenido contacto con madera. La composición volátil de la madera depende del origen geográfico de esta pero también está muy influenciada por los procesos a los que son sometidas las duelas, principalmente por el tostado (Alañón, Castro-Vázquez, Díaz-Maroto, Gordon, y Pérez-Coello, 2011; Caldeira, Climaco, de Sousa, y Belchior, 2006). En la tabla 1 se muestran los compuestos volátiles que el roble aporta al vino.

Tabla 1. Principales sustancias volátiles procedentes de la madera de roble

		ORIGEN	
Furanos	Furfural	POLISACÁRIDOS	
	Metilfurfural		
	Hidroximetilfurfural		
	Alcohol furfúrfico		
Otros heterociclos volátiles	Maltol		
	Dimetilpirazinas		
Ácido acético			
Aldehídos fenoles	Vinillina		LIGNINA
	Siringaldehído		
	Sinapaldehído		
	Coniferaldehído		
Fenil cetonas	Acetofenona		
	Aetovainillona		
	Propiovainillona		
	Butirivainillona		
Fenoles volátiles	Guayacol		
	Metil-guayacol		
	Etil-guayacol		
	Eugenol		
	Etil-4-fenol		
B-Metil γ -octolactona	Isómero cis	LÍPIDOS	
	Isómero trans		

3.2.2. *Compuestos fenólicos*

Además de los compuestos aromáticos, la madera de roble puede ceder al vino otros compuestos que participan principalmente en su sabor, aunque algunos de ellos tienen también importancia en la evolución del vino y en las transformaciones que sufren los pigmentos que aportan el color al vino. Básicamente se trata de compuestos fenólicos cedidos por la madera al vino como son los ácidos fenólicos, taninos gálicos, taninos elágicos y cumarinas.

❖ Ácidos fenólicos

En la madera de roble se han identificado ácidos fenólicos tales como ácido gálico, vainillínico, siríngico, ferúlico, sinápico, elágico, etc. De entre todos ellos, posee especial importancia el ácido elágico y el ácido gálico (Canas, Leandro, Spranger, y Belchior, 2000). Estos compuestos, además de aportar una cierta acidez, pueden participar en la evolución del color del vino tinto por su contribución como posibles copigmentos (Vivas, 1997) y su efecto protector de la oxidación de los antocianos (Vivas y Glories, 1996).

❖ Taninos hidrolizables

Prácticamente la totalidad de los taninos que se encuentran en la madera de roble pertenecen al grupo de los taninos hidrolizables divididos en galotaninos y elagitaninos.

Los taninos gálicos o galotaninos están formados por una molécula de glucosa, cuyos grupos hidroxilo están esterificados total o parcialmente con moléculas de ácido gálico. Estos compuestos presentan sabor ácido, ligeramente astringente y muy amargo. Sin embargo, su contribución al sabor del vino es mínima ya que, en realidad, la cantidad de estos taninos en la madera de roble es reducida (Vivas, 1997).

Los taninos elágicos o elagitaninos, por el contrario, son los compuestos fenólicos más importantes que puede ceder la madera de roble al vino debido a su abundancia. Destaca la presencia de elagitaninos de tipo C-glucosídicos que, debido a su alta polaridad, son solubilizados con facilidad por el medio acuoso del vino. Entre ellos se encuentran vescalagina, castalagina, grandinina y roburina E (Figura 3), siendo la castalagina y vescalagina los principales elagitaninos encontrados en la madera de roble (Scalbert, Monties, y Janin, 1989; Viriot, Scalbert, Dupenhoat, y Moutounet, 1994). Estos compuestos pueden contribuir de manera importante a la estructura del vino, aportándole astringencia. Además, las propiedades oxidorreductoras de estos compuestos hacen que su presencia en el vino influya en gran medida en la evolución de su color, tanto por su efecto protector de la oxidación de antocianos, como por su posible implicación en la combinación antociano-tanino que conlleva una mayor estabilidad de los pigmentos (Vivas, et al., 1996). Su capacidad de formación de acetaldehído favorece la polimerización de los flavanoles del vino, y también pueden unirse a ellos formando complejos flavanol-elagitaninos

(Saucier, Jourdes, Glories, y Quideau, 2006). Por tanto, solo una pequeña parte de los elagitaninos aportados por la madera se encuentran en el vino en forma libre, contribuyendo a las sensaciones de amargor y astringencia (Glabasnia y Hofmann, 2006). En el caso de que las concentraciones de elagitaninos llegaran a ser elevadas, esto daría lugar a vinos con características organolépticas no deseadas debido a lo que se denomina “sabor a tablón”. Sin embargo, durante el procesado de la madera, la concentración de estos compuestos se reduce considerablemente sobre todo durante el proceso de tostado.

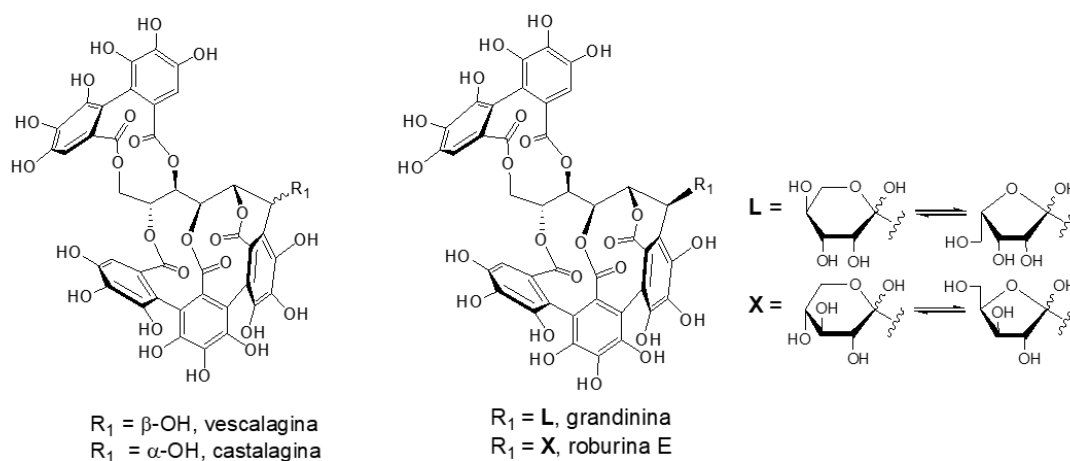


Figura 3. Estructura de los elagitaninos C-glicosídicos: castalagina, vescalagina, grandinina y roburina E

❖ Cumarinas

Las cumarinas pueden considerarse como derivados de los ácidos cinámicos que se forman mediante esterificaciones intramoleculares (Ribéreau-Gayon, et al., 2006), pudiendo encontrarse tanto en forma de heterósido como libres. En la madera de roble fresca estos compuestos se encuentran mayoritariamente en forma de heterósidos amargos. Sin embargo, durante el proceso de secado de la madera, como consecuencia del desarrollo de ciertos tipos de hongos, se produce la hidrólisis enzimática de los heterósidos formando los correspondientes aglicones, perdiendo así gran parte del amargor (Zamora, 2003).

3.3. Importancia de la madera de roble en el sector enológico

La madera de roble se ha utilizado desde hace siglos para la elaboración de las barricas donde se almacena el vino durante el envejecimiento. Aunque la función original de las barricas fue el simple almacenamiento y transporte de vino, se ha demostrado que durante el envejecimiento en las barricas de roble, el vino sufre una serie de transformaciones que conducen a cambios importantes en el aroma, color, sabor y astringencia (Glabasnia, et al., 2006; Puech, Feuillat, y Mosedale, 1999; Zamora, 2003). Este proceso entraña multitud de reacciones en las que

intervienen compuestos procedentes tanto de la madera utilizada, como del vino sometido al proceso de crianza. La naturaleza y cantidad de los compuestos de la madera que pasan al vino dependerá fundamentalmente de la composición química inicial de la barrica pero también de la capacidad de estos compuestos para ser cedidos al vino. Durante el proceso de envejecimiento en barrica tiene lugar, además, una microoxigenación natural a través de los poros de la madera. Este aporte de oxígeno es necesario para las reacciones de polimerización y combinación entre antocianos y flavanoles que conllevan a la estabilización del color y a la suavización de la astringencia.

Es evidente que el empleo de barricas para llevar a cabo los procesos de envejecimiento es una tarea cara, complicada y lenta. En la actualidad existen otras alternativas para el envejecimiento que intentan conseguir las mismas características en el vino, minimizando los costes y los tiempos que requiere la crianza en barrica de roble. La utilización de fragmentos de roble como alternativa al envejecimiento en barrica es una técnica bien conocida y aplicada en bodega desde hace muchos años (Hernández-Orte, et al., 2014; Jourdes, et al., 2011). Estos fragmentos de madera deben proceder exclusivamente del género *Quercus* y pueden utilizarse tanto en estado natural como tostado, pero sin llegar a la carbonización. La superficie de estos fragmentos no debe presentar partículas de carbón y no pueden ser sometidos a ningún tratamiento químico, enzimático o físico a excepción del tostado. Además, las dimensiones de estos fragmentos deben ser tal que al menos el 95 % en peso quede retenido en un tamiz con malla de 2 mm (CE_1507/2006, 2006). Teniendo en cuenta éstas especificaciones, las posibilidades existentes en el mercado son variadas, pudiéndose añadir tablas, chips o virutas entre otros (Fernández de Simón, Cadahía, del Álamo, y Nevares, 2010). El envejecimiento del vino utilizando fragmentos de madera suele aplicarse conjuntamente con técnicas de microoxigenación con el objetivo de lograr tanto la estabilización de la materia colorante y la suavización de la astringencia como el aporte de aromas y taninos elágicos que complementen sensorialmente al vino y aporten complejidad.

La relación entre la madera de roble y el vino va más allá de su implicación en las fases finales de envejecimiento a través de crianza tradicional o acelerada. La adición de madera y otras fuentes de copigmentos en las etapas iniciales de la vinificación, constituye una interesante posibilidad para la estabilización química del color del vino (Cejudo-Bastante, et al., 2017; Cejudo-Bastante, Rodríguez-Morgado, Jara-Palacios, Rivas-Gonzalo, Parrado, y Heredia, 2016; Gordillo, Baca-Bocanegra, Rodríguez-Pulido, Lourdes Gonzalez-Miret, Garcia Estevez, Quijada-Morin, et al., 2016; Nogales-Bueno, Baca-Bocanegra, Jara-Palacios, Hernandez-Hierro, y Heredia, 2017; Rivero, Gordillo, Jara-Palacios, Gonzalez-Miret, y Heredia, 2017). Los estudios sobre el impacto del cambio climático, ponen de manifiesto la necesidad de estas intervenciones en el sector enológico; las condiciones ambientales y climáticas están provocando un desfase importante entre

la madurez tecnológica y fenólica de la uva, aspecto que se hace aún más evidente en zonas de clima cálido (Gordillo, et al., 2012) y que conduce a uvas con una composición fenólica inadecuada y, por tanto, a vinos tintos demasiado amargos y/o astringentes y con colores pobres o irregulares (Mira de Orduña, 2010). La utilización para esta práctica enológica de la viruta cruda obtenida como residuo en el proceso de elaboración de las barricas supone, además, el aprovechamiento de un subproducto de la industria tonelera.

Numerosos factores condicionan la composición química y la extractabilidad de la madera de roble: desde la especie botánica, el origen geográfico o las condiciones de cultivo hasta las operaciones a la que es sometida antes de ser utilizada (cortado, secado, tostado, etc.) (Del Álamo Sanza y Nevares Domínguez, 2006; Del Alamo Sanza, Nevares Domínguez, Cárcel Cárcel, y Navas Gracia, 2004; Fernández de Simón, et al., 2010; Frangipane, Santis, y Ceccarelli, 2007). Además, en el empleo de las virutas de roble es importante tener en cuenta que, debido a su gran superficie de contacto, el vino extrae de manera mucho más rápida los compuestos procedentes de la madera pudiendo dar lugar a una cesión de compuestos que, sin el control adecuado, podría llegar a enmascarar los aromas propios de la uva. Teniendo en cuenta la variabilidad descrita para la madera, se hace indispensable el análisis individual de la composición química y la extractabilidad para conocer y asegurar el perfil organoléptico que se quiere conseguir en un determinado vino.

4. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Espectroscopia es el término general que se da a la ciencia que estudia las distintas interacciones entre la radiación y la materia. Las técnicas espectroscópicas se pueden definir, por tanto, como un amplio grupo de técnicas analíticas que tienen en común el uso de la interacción radiación electromagnética–muestra como vehículo para el análisis.

La interacción entre la radiación y la materia es un fenómeno complejo que depende tanto de la naturaleza de la materia como de las características de la radiación y cuyo resultado puede ser muy diverso (absorción, transmisión, reflexión o dispersión).

La radiación electromagnética puede considerarse una forma de energía que se propaga en línea recta en el vacío, constituida por dos campos que oscilan en fase, uno eléctrico y otro magnético, perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación de la radiación. Todas las radiaciones que incluye el espectro electromagnético son de la misma naturaleza, y solamente difieren en su energía, que a su vez abarca muchos órdenes de magnitud. Las regiones en las que se divide el espectro completo no están delimitadas de forma arbitraria, dependen del tipo de fenómeno que se produce al interactuar con la materia, como se verá más adelante (Skoog, Holler, y Crouch, 2009).

En el sector agroalimentario, el análisis de muestras mediante técnicas espectroscópicas tiene numerosas variantes en función de las características de las muestras analizadas (estado de agregación, tamaño, forma, textura, etc.) y de la radiación electromagnética usada (distintas zonas del espectro electromagnético).

Entre las técnicas espectroscópicas, son de gran utilidad aquellas que tienen en cuenta las interacciones radiación-materia a nivel molecular. La energía de las moléculas está cuantizada, es decir, las moléculas tienen un número limitado de niveles de energía de modo que para que se produzca la absorción de la radiación, la energía de los fotones excitadores debe coincidir exactamente con la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de las especies absorbentes. Como estas diferencias de energía son características para cada especie, el estudio de las frecuencias de la radiación absorbida proporciona un medio para caracterizar los componentes de una muestra (Skoog, et al., 2009). La energía total de una molécula puede definirse como la suma de la energía de los electrones, la energía de vibración y la energía de rotación.

La energía necesaria para provocar la promoción entre dos niveles electrónicos es muy superior a la asociada a transiciones entre niveles vibracionales, y estos muy superiores a las transiciones entre niveles rotacionales. Por tanto, para que se produzca un cambio electrónico de la molécula se necesita una radiación perteneciente a la región ultravioleta-visible del espectro,

caracterizada por altas frecuencias y bajas longitudes de onda. Los cambios vibracionales son generados por radiaciones de mayor frecuencia o menor longitud de onda pertenecientes a las regiones del infrarrojo medio o cercano (espectroscopía vibracional). Finalmente, las radiaciones menos energéticas, correspondientes a la región de las microondas y del infrarrojo lejano son las que provocan las transiciones entre los niveles rotacionales (espectroscopía rotacional) (Christen y Beltrán, 1977).

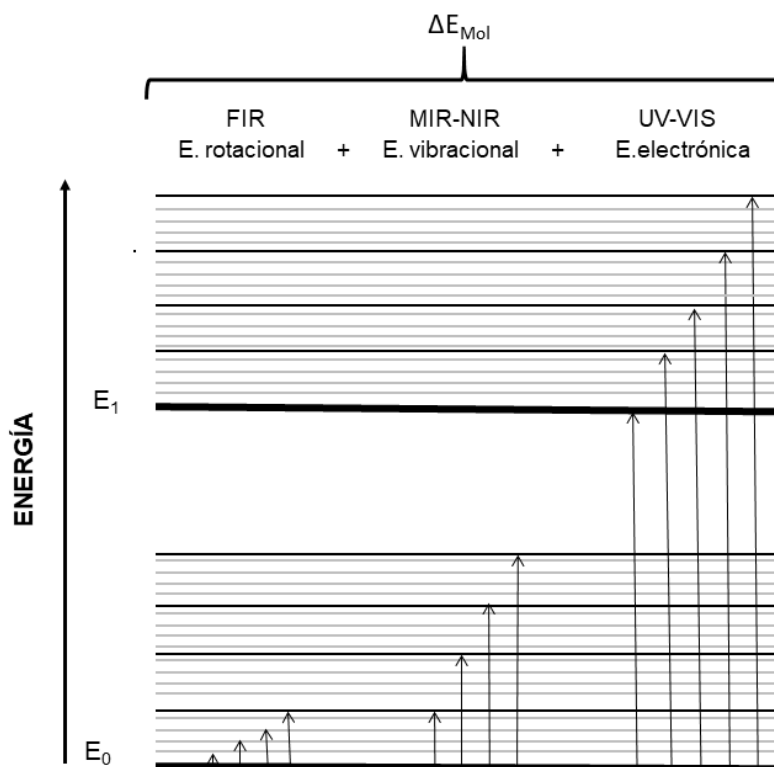


Figura 4. Niveles energéticos del enlace

Entre las técnicas espectroscópicas más útiles para el estudio de muestras agroalimentarias están la espectroscopía Raman y a la espectroscopía de infrarrojo englobadas en el término espectroscopía vibracional. La espectroscopía vibracional analiza las vibraciones que se producen en los enlaces de las moléculas que conforman una muestra. Cada molécula puede tener varios modos vibracionales distintos y cada modo puede cambiar en uno o más niveles vibracionales. En muestras complejas, como las agroalimentarias, se encuentran gran variedad de moléculas poliatómicas, por lo que la espectroscopía vibracional permite obtener huellas espectrales del compuesto o muestra analizada (Byrne, Ostrowska, Nawaz, Dorney, Meade, Bonnier, et al., 2014).

La espectroscopía Raman y de infrarrojo son en realidad dos técnicas complementarias. Aunque dependen de los mismos modos vibracionales, los mecanismos básicos surgen de procesos que son diferentes desde el punto de vista mecánico. La absorción en la región del infrarrojo requiere que haya un cambio en el momento dipolar permanente del enlace o en la

distribución de carga durante la vibración. Por el contrario, la dispersión Raman necesita una distorsión momentánea de los electrones distribuidos alrededor de un enlace de la molécula, seguida por la reemisión de la radiación cuando el enlace vuelve a su estado normal. En esta forma distorsionada, la molécula está temporalmente polarizada, es decir, produce de manera momentánea un dipolo inducido que desaparece cuando hay relajación y reemisión (Skoog, et al., 2009). Por tanto, la espectroscopía vibracional puede aportar información de una muestra desde dos puntos de vista diferentes y complementarios (Byrne, Sockalingum, y Stone, 2011; Christen, et al., 1977).

4.1. Espectrofotometría de absorción en la región ultravioleta–visible

(Skoog, et al., 2009)

La espectroscopia de absorción molecular de radiación ultravioleta y visible tiene aplicación en la identificación y cuantificación de gran cantidad de especies orgánicas e inorgánicas. Sin embargo, el análisis cualitativo tiene ciertas limitaciones. Como consecuencia del elevado número de niveles vibracionales y rotacionales asociados a cada nivel electrónico, los espectros de absorción moleculares ultravioleta y visibles son considerablemente complejos, están formados por multitud de líneas, tan próximas unas a otras que en la mayoría de los casos, se muestran como una banda, un todo continuo que a menudo abarca un intervalo considerable de longitudes de onda. Varias líneas de absorción muy próximas entre sí estarán asociadas a una transición electrónica de tal forma que los picos individuales son difícilmente detectables. Por tanto, la aplicación cualitativa o de determinación estructural de esta técnica tiene un carácter fundamentalmente orientativo.

La aplicación cuantitativa de esta técnica se basa en la conocida ley de Lambert-Beer que relaciona la cantidad de radiación absorbida por sustancias químicas líquidas o en disolución con la concentración de determinados componentes de la muestra.

Para llevar a cabo estas medidas se utilizan los denominados espectrofotómetros de absorción. Su eficacia, resolución, sensibilidad y rango espectral, dependerán de las variables de diseño y de la selección de los componentes ópticos que lo conforman. Un espectrofotómetro está constituido fundamentalmente por: fuente de iluminación, sistema monocromador que produce la dispersión espectral de la radiación incidente y proporciona un haz de energía radiante con una longitud de onda y una anchura de banda determinada, compartimento para alojar la muestra, detector y sistema de registro de señal o almacenamiento de datos. En esta región del espectro se utilizan comúnmente fuentes incandescentes con filamento de wolframio para emisión de luz visible y lámparas de arco rellenas de deuterio para la emisión de luz ultravioleta.

4.2. Espectroscopía de infrarrojo

Entre las radiaciones electromagnéticas utilizadas para el análisis de muestras agroalimentarias, la radiación infrarroja es una de las más importantes y más utilizadas. Esta radiación se relaciona con los movimientos vibracionales y rotacionales de los enlaces moleculares. Se divide a su vez en tres zonas en función de su cercanía al espectro visible: infrarrojo cercano, infrarrojo medio e infrarrojo lejano (NIR, MIR y FIR por sus siglas en inglés).

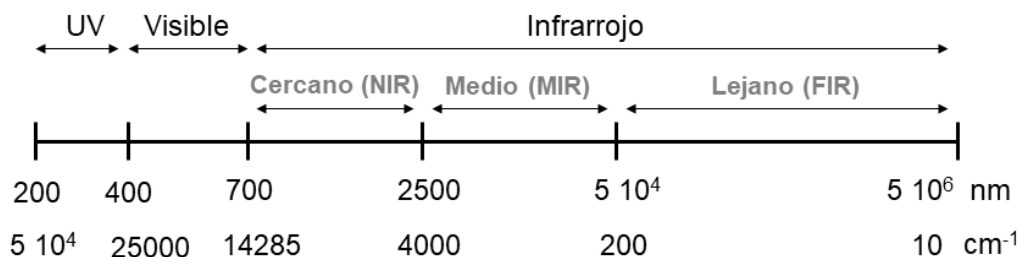


Figura 5. Espectros ultravioleta, visible e infrarrojo

Como se ha detallado anteriormente, la energía del infrarrojo medio es del orden de la energía necesaria para alterar el estado vibracional de un enlace. Energías menores (infrarrojo lejano) solo consiguen alterar los estados rotacionales de los átomos y moléculas presentes en la muestra, mientras que energías mayores, correspondientes a la región del infrarrojo cercano, permiten conseguir mayores transiciones vibracionales, los llamados sobretonos y bandas de combinación.

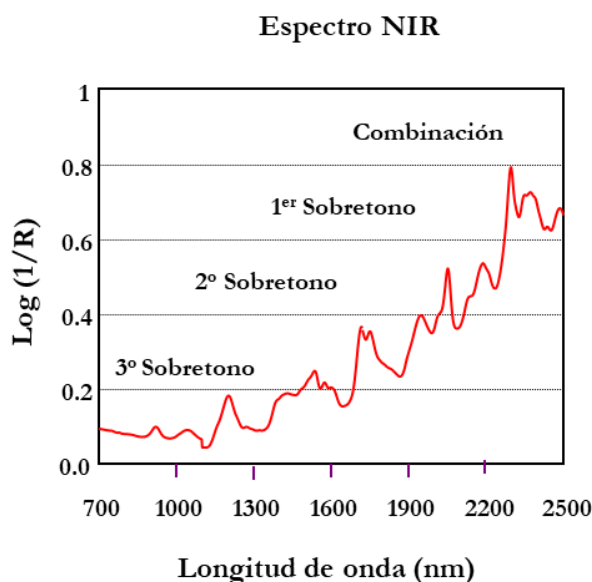


Figura 6. Características espectrales típicas de los espectros NIR

En el espectro infrarrojo aparecen, por tanto, bandas de absorción en longitudes de onda pertenecientes a las regiones del infrarrojo medio y del infrarrojo cercano. Las bandas del

infrarrojo medio son bandas intensas y estrechas por lo general ya que las transiciones de este tipo son relativamente frecuentes y se dan a longitudes de onda concretas para cada enlace y modo vibracional. Sin embargo, las bandas en el infrarrojo cercano son debidas a transiciones vibracionales entre niveles energéticos más distantes (sobretonos) y a combinaciones de varias transiciones fundamentales pertenecientes a distintos modos vibracionales. Los cambios energéticos que las producen son menos frecuentes y, por tanto, estas bandas son menos intensas. Además, en la región del infrarrojo cercano los sobretonos y las bandas de combinación de los distintos enlaces presentes en las muestras agroalimentarias se superponen, complicando enormemente la interpretación directa de esta región del espectro infrarrojo (Bokobza, 1998).

Teniendo en cuenta lo anterior, la espectroscopía de infrarrojo puede dividirse en dos técnicas claramente diferenciadas según la región del infrarrojo que utilicen (cercano o medio).

4.2.1. *Análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano*

El análisis de imagen hiperespectral permite obtener, de manera simultánea, información espacial y espectral de una misma muestra (Sun, 2010). Esta tecnología integra las características del análisis de imagen con las de técnicas espectroscópicas, lo que la ha convertido en pocos años en una técnica poderosa y en rápido crecimiento para el control de alimentos. Su utilidad y el motivo por el que el análisis de imagen hiperespectral está en auge radican en la esencia de su funcionamiento: en una imagen hiperespectral se encuentra asociado a cada uno de sus píxeles el espectro medio de la pequeña zona que representa este, pudiéndose llegar a relacionar la composición superficial de una muestra con el espectro de cada píxel.

Por tanto, el análisis de imagen hiperespectral se encuentra entre el análisis de imagen convencional y la espectroscopía superando, en algunos casos, a ambas técnicas (Tabla 2).

Tabla 2. Principales diferencias entre el análisis de imagen convencional, espectroscopía y el análisis de imagen hiperespectral.

Característica	Análisis de imagen	Espectroscopía	Análisis de imagen hiperespectral
Información espacial	✓	NO	✓
Información espectral	NO	✓	✓
Información Multiconstituyente	NO	✓	✓
Construcción de imagen química	NO	NO	✓
Facilidad de extracción de información espectral	NO	NO	✓

Las técnicas de imagen hiperespectral, al igual que la mayoría de las técnicas de análisis espectroscópico, pueden ser desarrolladas para trabajar usando reflexión, transmisión o fluorescencia. En el campo del análisis de alimentos se pueden encontrar ejemplos de las tres (Baiano, Terracone, Peri, y Romaniello, 2012; Barbin, Elmasry, Sun, y Allen, 2013; Kim, Kim, Chen, y Kong, 2004; Yoon, Lawrence, Smith, Park, y Windham, 2008) aunque lo más común es trabajar con reflectancias, que pueden transformarse fácilmente en absorbancias aparentes.

$$A = \log\left(\frac{1}{R}\right)$$

Para la industria de los alimentos, el análisis de imagen hiperespectral tiene un gran interés ya que permite conseguir una información precisa y detallada, pero sobre todo de forma más rápida que otras tecnologías. Es una técnica no destructiva y perfectamente apta para aplicaciones *on-line*, las cuales requieren una rápida respuesta para que otros equipos actúen de forma inmediata. Las características de esta técnica la hacen muy apropiada para la realización de dos procesos muy comunes en la industria de alimentos: la identificación de productos con una determinada cualidad y la determinación de su composición.

Para la realización del análisis de imagen hiperespectral no es necesaria una preparación de muestra tediosa, ya que la captura de la imagen se realiza sobre el alimento en su estado original. Además, es un método de análisis no contaminante y seguro, pues no necesita del uso de reactivos químicos. Una vez puesto a punto, tiene grandes ventajas económicas con respecto a los análisis tradicionales, es más rápido, requiere menos inversión en reactivos y no genera residuos. Por último, el hecho de ser una técnica no invasiva ni destructiva permite la utilización de la misma muestra para realizar otros análisis tras la captura de los datos hiperespectrales (Sun, 2010).

En el análisis de imagen hiperespectral se genera un hipercono de datos compuesto por la información espacial y el espectro de cada píxel. Tras la adquisición de datos existe la posibilidad de seleccionar determinadas regiones de interés (ROI por sus siglas en inglés). Esta selección se puede hacer de forma previa o posterior a la adquisición y es usada para seleccionar objetos con una determinada característica espectral.

Con esta técnica se consigue una buena resolución espectral y es posible realizar estudios cualitativos y cuantitativos para determinar uno o varios parámetros de forma simultánea. Otra característica interesante del análisis de imagen hiperespectral, al menos para muestras relativamente grandes o con cierta heterogeneidad, es que se puede realizar un mapa de composición de la muestra debido a que la composición está íntimamente relacionada con el espectro y a que se dispone de información espacial de la muestra.

De forma orientativa, los equipos de adquisición de imágenes hiperespectrales constan de una fuente de iluminación, con un espectro de emisión adecuado para medir en la zona del espectro electromagnético donde el detector es sensible, una zona de medida o portamuestras, un sistema óptico de recogida y guiado de la radiación electromagnética proveniente de la muestra (lentes, espejos, fibra óptica, etc.), un elemento dispersivo o espectrógrafo que separa la radiación en las distintas longitudes de onda, un detector y un sistema informático que permite gobernar el instrumento, guardar y tratar los datos adquiridos.

Los dispositivos de adquisición de imágenes hiperespectrales más utilizados en agroalimentación usan detectores sensibles en la zona del visible o del infrarrojo cercano. Son detectores compuestos a base de semiconductores que utilizan el efecto llamado unión p-n. Este efecto consiste en la unión de dos semimetales dopados con impurezas que permiten tener una estructura con electrones o huecos con cierta libertad de movimiento. Al incidir radiación electromagnética sobre el detector, se produce un movimiento de los electrones o huecos que puede ser fácilmente contabilizado y relacionado con la radiación recibida (Rogalski, 2003). Este tipo de detectores son usados en una amplia zona del espectro electromagnético. Los detectores a base de silicio trabajan principalmente en la zona visible del espectro aunque son sensibles también en una pequeña parte de la región del infrarrojo cercano (hasta 1000 nm). Sin embargo, el más utilizado en esta región es el detector InGaAs, el cual tiene gran sensibilidad, rápida respuesta y funciona en un amplio intervalo espectral, desde 900 a 1700 nm, o incluso hasta 2500 nm si se incrementa la proporción de Indio en la aleación, aunque esto genera una menor relación señal-ruido (Rogalski, 2003; Sun, 2010).

El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano y su aplicación a la industria enológica ha sido ampliamente estudiado (Nogales-Bueno, et al., 2016). Existen numerosos estudios que utilizan esta técnica para determinar parámetros de interés vitivinícola en uva. Entre ellos, se aplica el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano para predecir contenidos de compuestos fenólicos tanto en la baya completa como en la semilla (Chen, Zhang, Ning, Liu, Zhang, y Yang, 2015; Rodríguez-Pulido, et al., 2014), controlar la madurez fenólica y tecnológica de la uva (Nogales-Bueno, Hernández-Hierro, Rodríguez-Pulido, y Heredia, 2014), caracterización de semillas (Rodríguez-Pulido, Barbin, Sun, Gordillo, González-Miret, y Heredia, 2013) y en la caracterización de subproductos de vinificación (Jara-Palacios, Hernanz, Escudero-Gilete, y Heredia, 2016).

El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano también ha sido utilizado para la determinación de parámetros de interés en muestras de madera (Lestander, Geladi, Larsson, y Thyrel, 2012; Thumm, Riddell, Nanayakkara, Harrington, y Meder, 2010). Sin embargo, no se han encontrado referencias de la utilización de esta técnica al análisis de madera de roble con fines enológicos, si bien si se encuentra descrito en la literatura el uso de técnicas de infrarrojo

cercano convencional para la determinación de fenoles totales en madera de roble (Zahri, Moubarik, Charrier, Chaix, Bailleres, Nepveu, et al., 2008) y para la clasificación de duelas completas y su posterior uso en barricas teniendo en cuenta el contenido fenólico de las mismas (Giordanengo, Charpentier, Boizot, Roussel, Roger, Chaix, et al., 2009; Jourdes, et al., 2011).

4.2.2. Espectroscopía en el infrarrojo mediante transformada de Fourier

La espectroscopía de transformada de Fourier se basa en el interferómetro de Michelson, un elemento que divide la luz proveniente de la fuente de iluminación en dos haces. Uno de los haces se dirige hacia un espejo fijo y el otro hacia un espejo móvil. Ambos haces recorren caminos distintos, uno de ellos con una longitud variable y pasando por la muestra. El diferente camino óptico genera una diferencia de fase entre ambos haces además de diferencias espectrales debidas a que uno de los haces interacciona con la muestra (Skoog, et al., 2009).

El interferómetro genera interferencias constructivas o destructivas, según la posición del espejo móvil, y el detector mide la intensidad de esta radiación. Posteriormente, el sistema informático permite, con la ayuda de la transformada de Fourier, obtener el espectro de la muestra medida.

El uso de los instrumentos de transformada de Fourier tiene ciertas ventajas con respecto a los equipos dispersivos: tienen pocos elementos ópticos y ninguna rendija que atenúe la radiación. Como resultado, la potencia radiante que llega al detector es mucho mayor que en un instrumento dispersor, y se observan relaciones señal-ruido mucho mayores. Además, pueden medirse todas las longitudes de onda de forma simultánea ya que no es necesaria la utilización de una rejilla que seleccione la longitud de onda que llega al detector en cada momento. Esta característica facilita la obtención de datos de un espectro completo en tiempos más reducidos. Finalmente, los instrumentos de transformada de Fourier poseen alta potencia de resolución lo cual facilita el análisis de espectros complejos en los que el número absoluto de líneas y espectros implicados dificultan la determinación de las características espectrales individuales. Estas ventajas han provocado que la espectroscopía de transformada de Fourier en el infrarrojo haya sido ampliamente usada, en detrimento de la espectroscopía de redes de difracción (Siesler, Ozaky, Kawata, y Heise, 2002).

4.3. Espectroscopía Raman

El efecto Raman fue nombrado de esta manera en honor a su descubridor, el físico indio Sir C. V. Raman, que observó el efecto en la luz solar. Raman descubrió que la longitud de onda visible de una pequeña fracción de la radiación dispersada por ciertas moléculas difiere de la del haz incidente y, además, que los desplazamientos de la longitud de onda dependen de la estructura

química de las moléculas causantes de la dispersión. Como resultado de este descubrimiento surgió una nueva forma de espectroscopía, la espectroscopía Raman, basada en los fenómenos de dispersión inelástica de la radiación.

Una molécula puede absorber un fotón si la energía de este coincide con una diferencia entre niveles cuánticos, aunque, tras la colisión, el fotón también puede ser dispersado, independientemente de la energía de este. La mayoría de los fotones dispersados no sufren ningún cambio en su frecuencia y energía (dispersión elástica de Rayleigh) pero una pequeña fracción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando cambios de frecuencias con respecto a los fotones incidentes produciéndose así el denominado efecto Raman. La dispersión inelástica puede provocar aumentos o disminuciones de la energía del enlace que generan, respectivamente, líneas Stokes o anti-Stokes en el espectro Raman. Estas variaciones energéticas son debidas a cambios en los estados vibracionales o rotacionales de los enlaces presentes en la molécula, por lo que los desplazamientos energéticos de los fotones dispersados frente a los fotones incidentes son medidas directas de los distintos modos vibracionales o rotacionales de la molécula (Skoog, et al., 2009).

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzmann, el 99% de las moléculas se encuentran en el estado vibracional de menor energía, y por tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior, por lo que habitualmente se trabaja midiendo solo el efecto Stokes.

Aunque hay similitudes entre los espectros Raman y los espectros en el infrarrojo, hay suficientes diferencias entre las clases de grupos que son activos en uno u otro para hacer que las técnicas sean complementarias y no competitivas. Una ventaja importante de la espectroscopía Raman frente a la espectroscopía en el infrarrojo radica en que la molécula de agua es prácticamente pasiva frente al efecto Raman, lo que es de gran utilidad en la medida de muestras biológicas. Además, el efecto Raman, al ser provocado por una dispersión energética, puede aparecer en cualquier región del espectro electromagnético mientras que las absorciones medidas por la espectroscopía de infrarrojo están provocadas por transiciones vibracionales con energías confinadas en la región infrarroja del espectro. Por tanto, la espectroscopía Raman es una técnica extremadamente versátil ya que puede ser llevada a cabo excitando en las regiones UV, visible o infrarrojo cercano.

En los últimos años la espectroscopía Raman ha evolucionado de forma considerable y se ha establecido como una herramienta de laboratorio que rivaliza con la espectroscopía de infrarrojo convencional (Byrne, et al., 2011).

4.4. Espectroscopía Portátil

Las técnicas de espectroscopía vibracional representan un procedimiento analítico que goza de prestigio en la industria agroalimentaria como técnica rápida, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente para reemplazar a los tradicionales métodos analíticos de referencia. Los diferentes campos de aplicación de estas técnicas destacan su versatilidad. En el sector enológico, concretamente, la aplicación de la espectroscopía vibracional es bien conocida y su uso extendido. Son numerosos los trabajos desarrollados con resultados prometedores (Ferrer-Gallego, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, y Escribano-Bailón, 2010; Ferrer-Gallego, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, y Escribano-Bailón, 2011; Hernández-Hierro, Nogales-Bueno, Rodríguez-Pulido, y Heredia, 2013; Nogales-Bueno, et al., 2014; Rodríguez-Pulido, et al., 2014).

Sin embargo, a pesar de la eficiencia, rapidez y efectividad de estas técnicas para predecir diferentes parámetros en el sector agroalimentario, la mayoría de estos estudios deben ser llevados a cabo en el laboratorio y, por tanto, implican el transporte de muestras con los inconvenientes que ello conlleva. Para resolver este problema, y cumplir otras exigencias de la industria, en los últimos años el interés se ha dirigido hacia el desarrollo de una nueva generación de espectrómetros portátiles que permiten su uso directo en la localización original de la muestra gracias a la innovación en el diseño del sistema óptico y a la reducción de tamaño (De la Roza-Delgado, Garrido-Varo, Soldado, Gonzalez Arrojo, Cuevas Valdes, Maroto, et al., 2017; Perez-Marin, Paz, Guerrero, Garrido-Varo, y Sanchez, 2010; Pérez-Marín, Sánchez, Paz, Soriano, Guerrero, y Garrido-Varo, 2009; Prado, Fernandez-Ibanez, Gonzalez, y Soldado, 2011; Saranwong, Sornsrivichai, y Kawano, 2003; Wiedemair, De Biasio, Leitner, Balthasar, y Huck, 2018).

A pesar de que estos espectrómetros portátiles ofrecen varias ventajas, como análisis no destructivos e *in situ*, su desarrollo debe considerar algunos aspectos críticos, como costes, tamaño, peso, robustez, facilidad de uso, precisión de medida, ergonomía, diseño, etc. Las innovaciones tecnológicas en los instrumentos dispersivos portátiles han ido aumentando y por tanto, también lo han hecho las ventajas de estos instrumentos con respecto a los equipos de laboratorio. En la actualidad los equipos portátiles incorporan la precisión analítica necesaria para la identificación y cuantificación química con una resolución espectral equivalente a los instrumentos de mesa, lo que permite flexibilidad para el análisis en un entorno industrial ya que el equipo puede transportarse fácilmente (Sorak, Herberholz, Iwascek, Altinpinar, Pfeifer, y Siesler, 2012).

Actualmente las principales tendencias son hacia la miniaturización, aumentando la calidad de las especificaciones mientras se reduce el costo de los dispositivos. Se trata de sistemas vis/NIR

portátiles de bajo peso que no necesitan ninguna sonda, fibra óptica o fuente de iluminación externa porque todas las partes necesarias están incorporadas en su diseño miniaturizado.



Figura 7. *Espectrómetro portátil (MicroNIR™, VIAVI)*

El número de estudios publicados basados en el uso de espectroscopia portátil ha aumentado en la última década y se espera que aumente sustancialmente en los próximos años. Sin embargo, todavía queda camino por recorrer para optimizar el uso de estos equipos en análisis *in situ* en determinados sectores como por ejemplo el sector enológico, ya que hay que tener en cuenta que se debe compensar cualquier interferencia ambiental como luz, temperatura y humedad. A pesar de que son numerosos los trabajos que utilizan instrumentos portátiles, muchas de las aplicaciones han sido en realidad llevadas a cabo bajo condiciones de laboratorio (Ayvaz, Sierra-Cadavid, Aykas, Mulqueeney, Sullivan, y Rodriguez-Saona, 2016; Basri, Hussain, Bakar, Sharif, Khir, y Zoolfakar, 2017; Blakey, 2016).

5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopía óptica ha sido la técnica usada tradicionalmente para obtener información detallada de la naturaleza física de las superficies. Sin embargo, a pesar de que todavía es un recurso importante, la resolución de la microscopía óptica está limitada por los efectos de difracción respecto a la longitud de onda de la luz. Para obtener una resolución superior es necesario recurrir a alguno de los métodos de microscopía electrónica, que utilizan como fuente haces de electrones acelerados con longitud de onda asociada bastante menor de 1\AA , y por tanto, permiten obtener, al menos teóricamente, resolución atómica.

La microscopía electrónica de barrido, SEM del inglés *Scanning Electron Microscopy*, tiene su fundamento en la interacción producida entre un haz de electrones puntual y la superficie de una muestra sólida. La fuente de electrones está constituida normalmente por un filamento de wolframio. Los electrones son acelerados dentro de la columna de microscopía hasta una energía de entre 1 y 30 keV. Un sistema magnético constituido por lentes condensadoras y lentes del objetivo reducen las dimensiones del haz a un diámetro de 2 a 10 nm cuando llega a la muestra. El sistema de lentes condensadoras, que puede constar de una o más lentes, se encarga de que el haz de electrones llegue a la lente del objetivo, y ésta determina el tamaño del haz de electrones que incide sobre la superficie de la muestra. El barrido se efectúa mediante dos pares de bobinas electromagnéticas ubicadas dentro de la lente del objetivo; un par desvía el haz en la dirección x de la muestra, y el otro par lo desvía en la dirección y. Como resultado de la interacción entre el haz de electrones y la muestra, en la cámara de la muestra, se generan varios tipos de señales que pueden ser detectadas y procesadas para generar la imagen, manteniéndose el sistema a alto nivel de vacío (Skoog, et al., 2009).

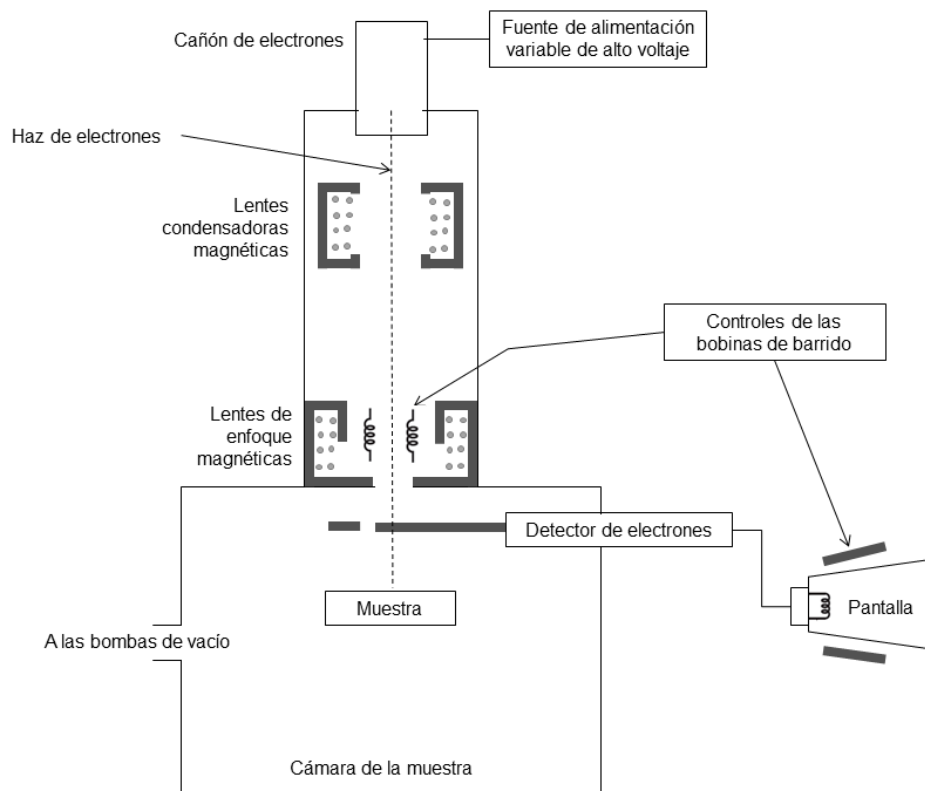


Figura 8. Esquema de microscopio electrónico de barrido adaptado de D.A. Skoog et al. *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, Madrid (2009)

Las señales producidas como resultado de la interacción entre el haz electrónico y la muestra son, en definitiva, las que darán lugar a la formación de las imágenes. Estas señales pueden ser: electrones secundarios, electrones retrodispersados y Auger; fotones debidos a la fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías (Figura 9). En los instrumentos para microscopía electrónica de barrido los electrones secundarios y retrodispersados son los que se utilizan para construir la imagen siendo el primero de ellos el modo estándar en la obtención de las mismas.

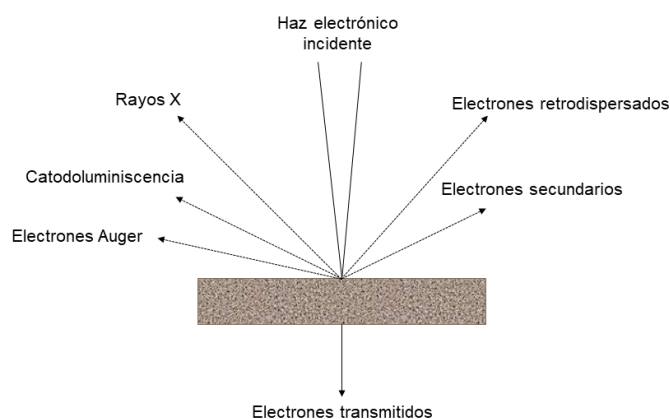


Figura 9. Diagrama de algunas de las señales generadas con un microscopio electrónico de barrido

El detector de electrones secundarios más utilizado en SEM es el conocido como detector de Everhart-Thornley. El detector consiste principalmente en un centelleador dentro de una jaula de Faraday dentro de la cámara de muestras del microscopio. Este detector aumenta su eficiencia gracias a la presencia de un tubo de luz que transporta la señal de fotones del centelleador, situado dentro de la cámara de muestras, al fotomultiplicador fuera de la misma.

A pesar de que existe una gran variedad de técnicas de microscopia electrónica de barrido que se han ido perfeccionando para obtener imágenes de muestras no conductoras, las más comunes requieren que la superficie de la muestra se cubra con una película metálica fina (~10 nm) producida por evaporación por bombardeo o por evaporación al vacío.

Los nuevos microscopios SEM trabajan utilizando como fuente de electrones un cañón de emisión de campo (Field Emission Gun, FEG) que proporciona haces de electrones de alta y baja energía más focalizados, lo que permite mejorar la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales, (0.02 - 5 kV). Esto permite minimizar cargas sobre la muestra causando, además, menos daños en muestras sensibles.

6. COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

El color es la respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa produce en la retina. Se considera un concepto psicofísico, relacionado al mismo tiempo con la psicología del observador, la fisiología de la visión y con la energía radiante espectral de la fuente luminosa. No se trata, por tanto, de una propiedad intrínseca del objeto que refleja o transmite la radiación electromagnética visible (380-770 nm), pues cambios en la fuente de iluminación o en el observador bastan para modificar el estímulo producido.

En la retina humana existen tres tipos diferentes de conos, cada uno de ellos sensible a una región del espectro visible: longitudes de onda larga (conos L), media (conos M) y corta (conos S). A partir de la información individual que los tres tipos de conos envían simultáneamente al cerebro cuando son estimulados por un estímulo cromático, este es capaz de interpretar todos los colores.

El estímulo cromático está compuesto por tres sensaciones bien diferenciadas que dan al color su carácter tridimensional: tono, claridad y saturación. El tono o matiz, es el atributo fundamental, un atributo cualitativo que nos permite clasificar los colores en rojizos, azulados, etc.; está relacionado con las diferencias de absorbancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda. La claridad es la característica que permite clasificar un color como claro u oscuro entre los extremos negro y blanco. Finalmente, la saturación o pureza determina, para cada tono, su grado de diferencia frente al gris de la misma claridad.

En la actualidad, los sistemas de color están regularizados por la Comisión Internacional de Iluminación, CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*), organismo encargado de recoger, evaluar y recomendar los diferentes avances en Colorimetría.

La Colorimetría surgió como ciencia para dar solución al problema de la medida del color de una manera objetiva, eliminando la dependencia de la componente psicológica del observador. Esta ciencia estudia la especificación numérica del color de un estímulo visual definido físicamente de manera que: estímulos con la misma especificación y bajo las mismas condiciones de observación aparecen iguales para un observador con visión normal de los colores, estímulos que aparecen iguales poseen la misma especificación y los números correspondientes a la especificación son funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de energía radiante espectral del estímulo.

El color se puede expresar de forma geométrica considerando un espacio de tres dimensiones denominado Espacio Triestímulo, en el que cada estímulo de color (Q) viene expresado por un vector expresión de las cantidades proporcionales de cada uno de los estímulos primarios: rojo

(R), verde (G) y azul (B). A partir de estas cantidades proporcionales, los *valores triestímulo* R G B, la CIE propone los distintos sistemas colorimétricos para la evaluación del color.

Con el objetivo de estandarizar las coordenadas de color y facilitar el intercambio y comparación de datos entre laboratorios, la CIE recomienda, para colorimetría general, utilizar unos estándares tanto en el iluminante como en el observador de referencia. Como iluminantes propone distribuciones espectrales relativas para varios tipos de fuentes, siendo el iluminante D65 el que la CIE recomienda en la mayoría de los casos. El iluminante D65 está relacionado con la radiación que emite un cuerpo negro (radiador total) a la temperatura de 6500 K. Se suele denominar “luz diurna” y corresponde aproximadamente con la luz de un día con el cielo cubierto de nubes. Como observador estándar, la CIE recomienda el observador de 10° de ángulo de visión, que recoge las funciones de igualación de color (series de valores triestímulo espectrales de cada estímulo monocromático en un determinado sistema de estímulos primarios) para un campo visual de 10°.

La CIE ha propuesto distintos sistemas de representación del color buscando la mejor correspondencia con la sensación visual percibida por el observador. De todos los propuestos, el espacio de color uniforme CIE 1976 $L^*a^*b^*$ (CIELAB) es el más empleado en la actualidad y es recomendado por la CIE para la mayoría de las aplicaciones industriales.

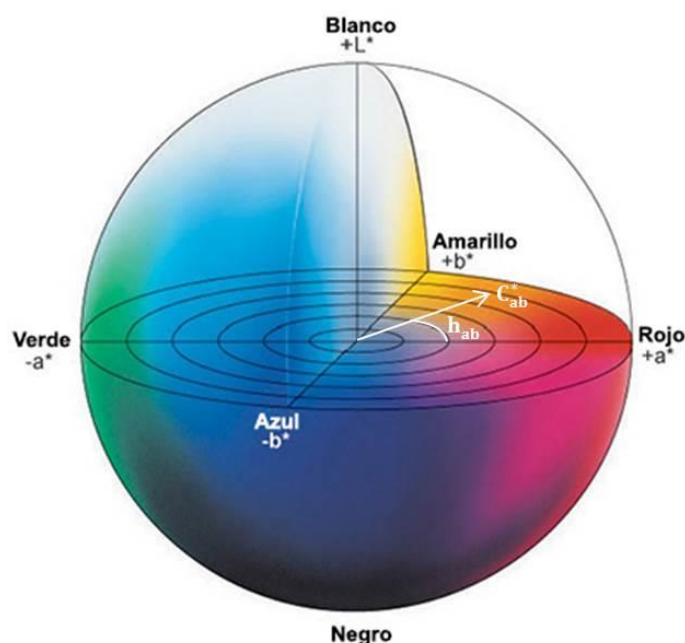


Figura 10. Representación del Espacio de Color CIE 1976–($L^*a^*b^*$).

El espacio CIELAB es un espacio tridimensional que queda definido, tal como muestra la (Figura 10), cuando se representan las coordenadas rectangulares $L^* a^* b^*$. La claridad L^* puede tomar

valores desde 0 hasta 100, de más oscuro a más claro. El tono h_{ab} es el ángulo con el eje de abscisas (a^*) y está comprendido entre 0° y 360° . El croma C^*_{ab} es la distancia entre el origen de coordenadas y el estímulo en cuestión.

7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

La cromatografía agrupa un conjunto importante de métodos que permiten la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En la cromatografía líquida, la muestra se disuelve con una fase móvil la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa (Sogorb Sánchez, 2006).

Inicialmente, la cromatografía líquida se llevaba a cabo en columnas de vidrio que tenían una longitud de varias decenas de centímetros y diámetros internos de 10 a 50 mm. Para asegurar tasas de flujo razonables a través de la fase estacionaria, las dimensiones de las partículas sólidas se mantenían en más de 150 a 200 μm . Incluso así, las tasas de flujo eran bajas, de un máximo de una pocas décimas de mililitro por minuto. Por consiguiente, los tiempos de separación eran largos, a menudo de varias horas. Los intentos para acelerar el procedimiento clásico mediante la aplicación de vacío o por bombeo no resultaron efectivos ya que generaban pérdidas de eficiencia y rápidos deterioros de los equipos.

Con el tiempo se descubrió que se podía aumentar de forma notable la eficiencia de la columna al disminuir el tamaño de las partículas y mejorar su empaquetamiento. Sin embargo, fue apenas a finales de los años sesenta cuando se perfeccionó la técnica adecuada para producir y utilizar empaques de tamaño de partícula tan pequeños como del orden de 3 a 10 μm . Esta técnica requería instrumentos más complejos que contrastaban de manera notable con las sencillas columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica cuyo flujo se debía a la gravedad. Las nuevas columnas necesitaban una mayor presión para operar a flujos aceptables, por lo que se substituyó el vidrio por metal, y tenían una menor capacidad de carga, es decir, aceptaban menor cantidad de muestra para analizar. Por consiguiente, fue necesario el desarrollo de detectores capaces de registrar señales originadas por muy pequeñas cantidades de electrolito. Para diferenciar estos procedimientos más nuevos de los métodos originales de flujo por gravedad se empleó la denominación de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica más utilizada para el análisis de compuestos fenólicos (Markham, 1982). Mediante esta técnica se puede conseguir la separación rápida y eficiente de mezclas complejas, seleccionando adecuadamente los eluyentes, la columna, el flujo, la temperatura y el gradiente (Hong y Wrolstad, 1990a, 1990b).

❖ *Columnas*

Las columnas analíticas de HPLC son cilindros de acero de entre 10 y 25 cm de longitud y 4-5 mm de diámetro interno. La fase estacionaria se halla en el interior de los cilindros, siendo lo más común fases estacionarias en fase reversa a base de sílice químicamente modificada mediante la inclusión de cadenas de hidrocarburos. Pueden encontrarse columnas con cadenas constituidas por 8 y por 18 átomos de carbono (C8 y C18 respectivamente) siendo más usadas estas últimas. El tamaño de partícula de la fase estacionaria oscila entre 2 y 10 μm , dimensiones que se consideran el mejor compromiso entre capacidad, consumo de fase móvil, velocidad de elución y resolución.

❖ *Fases móviles*

Existe una gran variedad en cuanto a fases móviles dependiendo de las características de los analitos que componen la muestra. Para muestras con composición polifenólica se suele usar como fase móvil un gradiente binario, formado por un solvente polar acidificado y otro menos polar. Los modificadores orgánicos que más comúnmente se utilizan en las fases móviles son el acetonitrilo y el metanol.

Con el fin de minimizar las colas de los picos cromatográficos, habitualmente se acidifican las fases móviles. Los acidificantes más frecuentes son el ácido acético y el ácido fórmico, con este último se obtiene mejor resolución. El ácido trifluoroacético también ha sido ampliamente utilizado debido a las ventajas que ofrece por ser un ácido menos corrosivo y que mejora la reproducibilidad de los tiempos de retención de antocianos (Lopes-da-Silva, de Pascual-Teresa, Rivas-Gonzalo, y Santos-Buelga, 2002).

❖ *Detectores*

El detector registra una propiedad físico-química del material eluido por la columna en función del tiempo. El sistema de detección más habitual en HPLC es la detección ultravioleta/visible (UV-Vis), utilizando matrices de fotodiodos como sensores. Sin embargo, también se usan sistemas de detección por fluorescencia o electroquímica cuando la absorbancia de los compuestos en UV-Vis es muy baja.

La detección mediante espectrometría de masas ha progresado mucho en las dos últimas décadas por ser el detector más sensible, selectivo y universal de los existentes. La técnica de HPLC-MS tiene la capacidad de proporcionar huellas dactilares de un producto particular sometido a elución en lugar de confiar solo en el tiempo de retención. La combinación permite la determinación funcional y estructural de las moléculas, con una elevada sensibilidad y límites de detección muy bajos, y de forma más rápida y fiable (Skoog, et al., 2009).

8. QUIMIOMETRÍA

La quimiometría es una disciplina que utiliza las matemáticas, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar los procedimientos óptimos de experimentación y proporcionar la máxima información analizando los datos y sistemas químicos (Vandeginste, Massart, y Buydens, 1998).

El análisis espectroscópico proporciona una señal de conjunto que contiene toda la información física y química de la muestras y para obtener la respuesta buscada es necesaria la aplicación de diversas técnicas quimiométricas que sean capaces de extraer dicha información.

Atendiendo al tipo de información que se necesite obtener (respuesta categórica o de escala) los métodos se dividen en cualitativos o cuantitativos.

Los cualitativos o métodos de reconocimiento de pautas, se pueden subdividir en métodos supervisados y no supervisados, dependiendo de si se conoce o no *a priori*, si el objeto pertenece a una clase determinada. Los métodos no supervisados buscan agrupamientos en un espacio n -dimensional sin conocer las clases a las que pertenece el objeto; sin embargo, en los supervisados se tiene un conocimiento previo de las clases y posteriormente, tras generar el modelo, se obtiene a cuál de ellas pertenece un determinado objeto.

En el caso de los métodos cuantitativos, se puede hacer una primera división entre métodos univariantes y multivariantes. Dentro de éstos se distingue entre modelos lineales y no lineales dependiendo del tipo de función matemática que presente su algoritmo. Tradicionalmente, los modelos lineales han sido los más empleados debido a su mayor sencillez. Si se opera con las variables originales, se utiliza la regresión lineal múltiple, y cuando se trabaja con variables reducidas, se usa la regresión por componentes principales o la regresión por mínimos cuadrados parciales (Breton, 2003; Vandeginste, et al., 1998).

8.1. Pretratamientos espectrales

Los principales problemas que presentan los espectros en espectroscopía de infrarrojo y Raman se encuentran asociados a la dispersión de la luz, considerada en este caso desde un punto de vista macroscópico, y en el caso particular de la espectroscopía Raman a la fluorescencia. La dispersión de la luz se origina por características físicas de la muestra como el tamaño de partícula, la forma o el grado de compactación o factores externos como la temperatura o la humedad. Además, también tienen influencia aspectos relacionados con la medida instrumental, unido a la forma de los espectros en el infrarrojo cercano y en algunas regiones del infrarrojo medio con bandas muy anchas que se solapan.

En espectroscopía Raman, la iluminación usada para excitar la muestra puede producir fluorescencia. Este fenómeno se da principalmente en muestras coloreadas cuando la excitación se produce en la región UV–visible. El uso de fuentes de iluminación que emiten en el infrarrojo cercano reduce sobremanera este efecto, aunque también reduce la intensidad de las señales Raman. Por esto, en algunos casos, incluso una débil fluorescencia puede enmascarar las señales Raman.

La combinación de los pretratamientos que se describen a continuación ofrece un amplio abanico para intentar eliminar o reducir los efectos que enmascaran, de alguna forma, la señal apropiada para el propósito analítico. Los pretratamientos comúnmente utilizados son:

Promediado de espectros: el promediado pretende, entre otras cosas, reducir el ruido aleatorio, y por tanto aumentar la relación señal/ruido, por lo que se usa en diferentes ramas de la espectroscopía con buenos resultados. Es un método muy efectivo en análisis de imagen hiperespectral debido a la gran cantidad de espectros que proporciona una imagen.

Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión MSC (Multiplicative Scatter Correction): los efectos de la dispersión de la luz se asocian principalmente a factores físicos como puede ser el tamaño de partícula o de muestra. Estos efectos pueden ser aditivos o multiplicativos, afectando a la relación del espectro con las propiedades químicas de la muestra. Mediante este tratamiento se pretende evitar que los efectos de la dispersión se impongan a las propiedades químicas de la muestra. La corrección se efectúa utilizando un espectro ideal, que suele ser el espectro medio del conjunto de muestras. En general, esta corrección mejora la linealidad de los espectros y conserva la información química a la vez que se minimizan las diferencias entre los espectros (Geladi, Macdougall, y Martens, 1985) presenta el inconveniente de que es necesario realizar de nuevo los cálculos cuando se hace algún cambio en el conjunto de muestras; recalculando el espectro medio y por consiguiente todos los parámetros.

Tipificación de la absorbancia SNV (Standard Normal Variate): al igual que el anterior, este tratamiento intenta minimizar la dispersión debida principalmente a factores físicos, como puede ser el tamaño de partícula o de muestra. Este tratamiento se aplica individualmente a cada espectro y por tanto no necesita el cálculo de un espectro medio o de referencia, ni rehacer los cálculos si se elimina alguna muestra del conjunto inicial. Existe una relación lineal con MSC, haciendo que los resultados ofrecidos por ambos métodos sean similares (Barnes, Dhanoa, y Lister, 1989).

Corrección de la tendencia DT (Detrend): este tratamiento se aplica de forma individual a cada espectro e intenta minimizar la curvatura de la línea base, que surge como consecuencia del diferente tamaño de partícula o de muestra y del distinto grado de compactación en su empaquetamiento. Cada espectro, después de esta corrección, tiene una media igual a cero y una desviación estándar distinta a la unidad (Barnes, Dhanoa, y Lister, 1989).

Derivadas: son una herramienta muy utilizada en el procesado de los espectros en el infrarrojo cercano porque permiten disminuir sus problemas más característicos: bandas solapadas y variaciones en la línea base ocasionadas por características físicas de la muestras, como pueden ser el tamaño de partícula, empaquetamiento de muestras sólidas y otra serie de factores relacionados con las muestras y su presentación. El método para el cálculo de las derivadas emplea el método *gap* o segmento, utilizando la información de un segmento localizado en el espectro para calcular la derivada. Previamente se puede aplicar un suavizado sustituyendo los datos de un segmento por el valor promedio. La utilización de la primera derivada, pendiente de la curva espectral, elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, por lo que corrige desplazamientos de la línea base. La segunda derivada representa el cambio de pendiente de la curva espectral, y además, corrige los términos que varían de forma lineal con la longitud de onda. No suelen utilizarse derivadas superiores a la segunda ya que suponen un aumento del ruido en las medidas espectrales. La notación utilizada consta de 4 dígitos como *a,b,c,d*, siendo *a*, el orden de derivada, *b*, el número de puntos en los cuales se realiza la derivada, *c* el número de puntos en los cuales se realiza el primer suavizado y *d*, el número de puntos en los cuales se realiza el segundo suavizado (Shenk y Westerhaus, 1995). En este método de derivadas y suavizado se introduce una variable que es el segmento en el cual se realizan estas correcciones. Un segmento demasiado pequeño puede aumentar el ruido espectral, mientras que uno demasiado grande puede hacer que no se represente el comportamiento del espectro en el resultado o eliminar información importante (Infrasoft International LLC, 2000).

Eliminación de la línea base: además de términos constantes y linealmente dependientes a la longitud de onda, los espectros pueden presentar otras modificaciones no lineales de la línea base, tanto en Raman como en el infrarrojo. Estas modificaciones son difíciles de eliminar mediante los tratamientos anteriores. En espectroscopía Raman suelen ser debidas a dispersiones de Rayleigh residuales que los procesos de filtrado de señal no han podido suprimir por completo o a fenómenos de fluorescencia producidos fundamentalmente por moléculas orgánicas inherentes a la muestra o provenientes de algún tipo de contaminación. En espectroscopía de infrarrojo, heterogeneidades en el sólido, contaminación lumínica o absorciones no controladas pueden provocar también este efecto. La eliminación de esta línea base permite obtener señales más fácilmente interpretables, pudiendo así dilucidar mejor las longitudes de onda donde aparecen los picos o la intensidad de estos (Goehner, 1978; Mazet, Carteret, Brie, Idier, y Humbert, 2005).

Existen procedimientos que estiman la línea base usando ajustes por regresión de mínimos cuadrados, en los que se necesita que el usuario identifique y seleccione partes de los espectros pertenecientes a la línea base, sin incluir picos espectrales (Goehner, 1978). Sin embargo, seleccionar los puntos correctos no es siempre sencillo, puede ser un proceso bastante complejo y lento si deben de ser procesados un gran número de espectros. Para automatizar el proceso de

eliminación de la línea base de los espectros se han desarrollado métodos basados en la minimización de funciones de costo no cuadráticas, donde no existe la necesidad de seleccionar manualmente zonas pertenecientes a la línea base (Lieber y Mahadevan-Jansen, 2003; Mazet, et al., 2005).

Los ajustes a la línea base espectral mediante funciones de costo no cuadráticas se diseñan para que a valores de error cercanos a 0 (en regiones donde la función de costo y el espectro a ajustar están próximos), el ajuste sea similar al conseguido con funciones cuadráticas. Sin embargo, para mayores errores (en regiones donde la función de costo y el espectro a ajustar no están próximos) el comportamiento del ajuste sea lineal. De esta forma, las funciones de costo no cuadráticas permiten ajustar la línea base de los espectros a funciones poligonales sin tener en cuenta los picos. En este tipo de ajustes, el usuario tiene que definir un umbral que permite que el algoritmo diferencie los picos espectrales de la curvatura natural de la curva base (Mazet, et al., 2005).

Transformada de Fourier: el uso del interferómetro en espectroscopía implica la adquisición de datos a periodos regulares en el tiempo, por lo que se obtiene una señal en el dominio del tiempo. De esta forma se consigue una mayor velocidad de adquisición de datos que usando medios convencionales (espectroscopía de difracción). Sin embargo, el dominio del tiempo no es fácilmente interpretable, y es necesaria una herramienta que transforme la señal al dominio de las frecuencias, es decir, al dominio donde los datos aparecen ordenados según la frecuencia.

8.2. Análisis cualitativos utilizados

8.2.1. Análisis discriminante lineal (LDA)

El análisis discriminante es un método de clasificación supervisada que crea un modelo predictivo para determinar la pertenencia de una muestra a un grupo. El modelo está compuesto por una función discriminante (o, para más de dos grupos o categorías, un conjunto de funciones discriminantes $q - 1$) basada en combinaciones lineales de las variables predictoras que proporcionan la mejor discriminación posible entre los grupos. Las funciones se generan a partir de un conjunto de casos para los que se conoce el grupo de pertenencia; posteriormente, las funciones pueden ser aplicadas a nuevos casos que dispongan de datos para las variables predictoras pero de los que se desconozca el grupo de pertenencia.

El análisis discriminante es una técnica estadística capaz de determinar qué variables permiten diferenciar a los grupos y cuántas de estas variables son necesarias para alcanzar la mejor clasificación posible. La pertenencia a los grupos, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente (una variable categórica con tantos valores discretos como grupos). Las variables en

las que se supone que se diferencian los grupos se utilizan como variables independientes o variables discriminantes. Estas variables deben ser cuantitativas continuas, o al menos, admitir un tratamiento numérico con significado. El análisis discriminante aprovecha las relaciones existentes entre las variables independientes para maximizar la capacidad de discriminación. No todas las variables independientes de las que se parte para realizar un análisis discriminante influyen en la misma medida en el resultado final. Además, el uso de todas las variables implicaría disponer de un número de muestras igual al de variables para que el sistema tuviese solución. Debido a esto, existen distintos algoritmos para seleccionar las variables independientes usadas en el análisis discriminante: algoritmos de selección de variables hacia adelante, eliminación hacia atrás y de regresión por pasos.

- Los algoritmos de selección hacia adelante comienzan eligiendo la variable que más discrimina entre las q categorías. A continuación seleccionan la segunda más discriminante y así sucesivamente. Cuando ninguna de las variables que quedan por elegir discrimina de forma significativa entre los grupos analizados el algoritmo finaliza y no se seleccionan más variables.
- Los algoritmos de eliminación hacia atrás proceden de forma inversa. Se comienza suponiendo que todas las variables son necesarias para discriminar y se elimina la menos discriminante entre los grupos analizados y así sucesivamente. Cuando todas las variables no eliminadas discriminan significativamente entre los grupos analizados el algoritmo finaliza.
- Los algoritmos de regresión por pasos utilizan una combinación de los dos algoritmos anteriores. Permiten la posibilidad de rectificar, eliminando del conjunto seleccionado una variable introducida en el conjunto de discriminación en un paso anterior o introduciendo en dicho conjunto una variable previamente eliminada.

Para construir el modelo, es necesario asignar los objetos del conjunto de entrenamiento a una categoría dada. Para ello, se añade una variable categórica a la matriz de datos conteniendo tantas categorías como sean necesarias. El análisis discriminante estima los coeficientes a_1, a_2, \dots, a_m , de la función discriminante lineal, f :

$$f = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_mx_m$$

que es capaz de predecir la pertenencia de los objetos a una u otra categoría. Por encima de un cierto valor de f , el objeto queda clasificado en una determinada categoría, y por debajo de dicho valor en otra.

Las funciones discriminantes se construyen de una en una, buscando las direcciones del espacio que maximizan la expresión:

$$\lambda' = \frac{SC_D}{SC_I}$$

donde SC_D es la suma de los cuadrados de las distancias euclídeas entre los objetos que pertenecen a distintas categorías, en la dirección que indica la función discriminante, y SC_I la suma de los cuadrados de las distancias euclídeas entre los objetos pertenecientes a la misma categoría, también en la dirección de la función discriminante. La primera función discriminante es la dirección del espacio en la que los grupos se ven más separados entre sí, y a la vez más compactos internamente. Análogamente, la segunda función discriminante es la dirección del espacio que, siendo ortogonal a la primera, cumple con el mismo criterio.

La función λ' no está acotada, por lo que varía solamente con el número de objetos y con la separación entre ellos. Por ello, en lugar de maximizar λ' , se suele minimizar la lambda de Wilks (λ_W), que se define como:

$$\lambda_W = \frac{1}{1 + \lambda'} = \frac{SC_I}{SC_I + SC_D}$$

La lambda de Wilks tiene valores entre 0 y 1. Categorías con una separación nítida, dan valores de λ_W cercanos a 0, mientras que categorías ampliamente solapadas dan valores cercanos a la unidad.

Se evalúa la bondad del modelo por medio del porcentaje de casos correctamente clasificados en las diferentes modalidades de validación existentes (interna, cruzada, una muestra fuera o externa) (Ramis-Ramos y García-Álvarez-Coque, 1999).

8.2.2. *Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales (DPLS)*

Este método de reconocimiento de pautas prefijadas se fundamenta en la realización de una regresión por mínimos cuadrados parciales sobre unas variables categóricas denominadas *dummy*. El método de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se describirá más detalladamente en el apartado de métodos cuantitativos, si bien es necesario hacer una breve referencia.

Básicamente, un método PLS trata de concentrar la información relevante contenida en las variables medidas, en un número menor de variables sin pérdida de información relevante; en la construcción de estas nuevas variables se tiene en cuenta el dato de referencia. La regresión se realiza con estas nuevas variables, simplificando el modelo de calibración y la interpretación de los resultados. Dependiendo si el modelo se realiza para un solo analito o dato de referencia o

para varios a la vez, tendremos las modalidades de PLS 1 y PLS 2 respectivamente (Brereton, 2003; Vandeginste, et al., 1998).

Puesto que en el desarrollo del modelo se conoce a priori el grupo al cual pertenecen las muestras, se organizan archivos que contengan los espectros de todas las muestras pertenecientes a una misma clase, tantos como clases existan. Automáticamente se genera una matriz temporal con las muestras de todas las clases y unas nuevas variables *dummy*, tantas como clases existan.

El porcentaje de muestras correctamente clasificadas en las clases a las que pertenecen indica finalmente la bondad del modelo desarrollado. Si la predicción se realiza sobre las muestras que han servido para desarrollar el modelo estaremos realizando la validación interna del mismo, por el contrario, si las muestras son distintas a las utilizadas en la obtención del modelo estaremos realizando una validación externa.

8.2.3. Agrupamiento mediante el algoritmo de *K*-medias

El agrupamiento mediante el algoritmo de *K*-medias es uno de los métodos no supervisados más simples para la clasificación de muestras en un número de grupos a determinar por el usuario. Este método, agrupa las muestras de acuerdo a su grado de similitud. Analiza las variables independientes y forma grupos con características similares en cuanto a estas variables. El número de grupos (*k*) debe ser elegido *a priori* por el usuario, quien debe de disponer de la información necesaria para realizar esta elección.

Inicialmente, el algoritmo define *k* centroides maximizando la distancia que separa unos de otros. Seguidamente, cada punto perteneciente al set de datos es asignado al grupo del centroide más próximo. Cuando todos los puntos han sido asignados a un grupo, los centroides son recalculados como los baricentros de los grupos creados previamente. Tras esto, vuelven a reasignarse todos los puntos al grupo cuyo centroide es más cercano y se recalculan los centroides. El proceso se repite hasta que el cálculo de los centroides arroja unos resultados suficientemente similares a los del paso anterior dando por finalizado el proceso iterativo (MacQueen, 1967).

8.2.4. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA), es un método de análisis quimiométrico cualitativo habitual en análisis multivariante. Mediante reconocimiento de pautas, el objetivo es reducir el número de variables iniciales, sin perder información y así poder observar estructuras y tendencias en las muestras.

El PCA (Deane, 1992) consiste en:

- Estimar la dimensionalidad real de los datos de las muestras estudiadas; y reducir esta dimensionalidad manteniendo la información relevante del sistema.
- Calcular un nuevo sistema de coordenadas, para lo que se buscan las direcciones que expliquen la máxima variabilidad en los datos de las muestras. Estos nuevos ejes se denominan componentes principales (PCs). Así el primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad de los datos de las muestras; el segundo, se escoge de forma que sea perpendicular al primero, y que explique la máxima variabilidad de los datos de las muestras una vez restada la explicada por el primer componente principal y así sucesivamente.
- Definir estos nuevos ejes matemáticamente, mediante cargas o pesos (*loadings*) que son los cosenos de los ángulos que forman cada uno de estos nuevos ejes con los antiguos, y las puntuaciones (*scores*) que son las coordenadas en estos nuevos ejes, de tal forma que:

$$\begin{aligned} \text{Espectro de la muestra} &= (\text{score } 1) (\text{loading } 1) + (\text{score } 2) (\text{loading } 2) \\ &+ \dots \dots + \text{ruido espectral } (E \sim \text{residual}) \end{aligned}$$

Los componentes principales se pueden interpretar geoméricamente de tal forma que el espectro medido a J longitudes de onda, constituye un conjunto de J variables que puede ser descrito como un vector. Se puede construir un espacio de J dimensiones, de tal manera, que cada dimensión corresponda a una de las longitudes de onda, y se pueda representar el mismo objeto como un punto en ese nuevo espacio. Si tenemos M muestras, se pueden representar como M puntos en el espacio de J dimensiones. El objetivo del PCA es hallar las direcciones en que están agrupados los M puntos de los objetos en el espacio de J dimensiones, y reducir el sistema inicial J dimensional a uno A dimensional, con $A < J$ manteniendo la información relevante del sistema. Geométricamente es un cambio de ejes, representando esas muestras en un sistema de coordenadas con un número inferior de ejes al utilizado inicialmente.

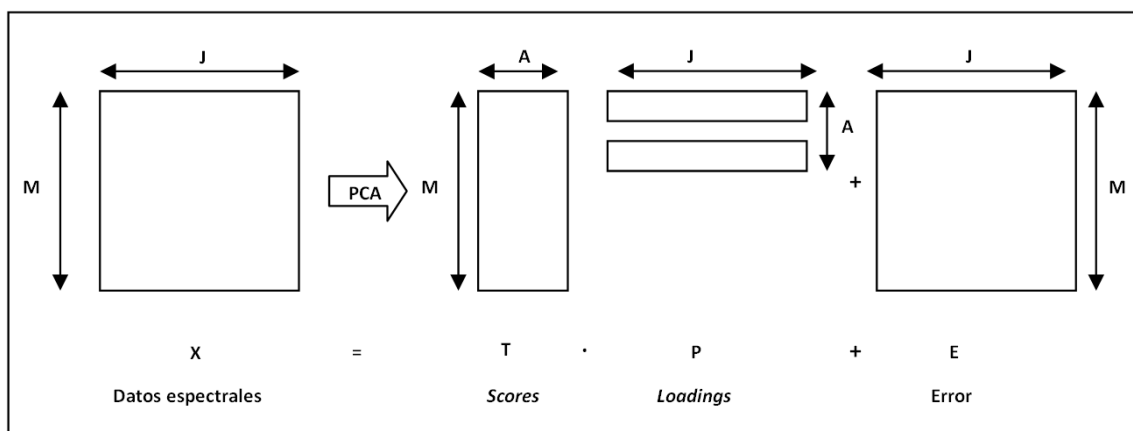


Figura 11. Descomposición de un conjunto de espectros mediante análisis de componentes principales

Otra propiedad muy importante de los PCs es la ortogonalidad. El método busca las direcciones ortogonales que expliquen la máxima variabilidad de los datos de las muestras, utilizando estas direcciones como nuevos ejes de coordenadas o PCs.

Resumiendo, el PCA se utiliza para reducir el número de variables originales correlacionadas, a un número de variables no correlacionadas en un nuevo sistema de ejes ortogonales denominados PCs.

El método para el procesado de datos o escalado será un centrado de datos, el valor medio corresponde al centro del modelo y los valores de todas las variables se refieren a ese centro.

La detección de espectros fuera de la población (*outliers*) se lleva a cabo utilizando la distancia de Mahalanobis (H). Se establece la diferencia espectral de una muestra respecto a la media espectral del conjunto de muestras (H), tomando como valor límite $H = 3$, de forma que aquellos espectros cuya distancia H sea superior a 3.0 se desechan. Las muestras con los datos espectrales originales se ordenan de acuerdo con la distancia de Mahalanobis (H) obtenida anteriormente, esto resulta muy útil en procesos posteriores a la hora de construir los grupos de validación cruzada, de manera que los subgrupos resulten homogéneos. También mediante este proceso de análisis de componentes principales se puede observar qué muestras resultan espectralmente diferentes, sin rebasar el valor de $H = 3$, con objeto de decidir su inclusión en el conjunto de calibración.

Mediante este análisis de componentes principales se puede determinar si una nueva muestra está dentro del espacio determinado por el conjunto de calibración cuantitativa mediante la distancia de Mahalanobis (H) con valor límite de 3, antes de realizar una medida cuantitativa. Aquellas muestras que no pertenezcan al espacio espectral no deben ser predichas, se debe realizar un análisis de referencia y guardar el espectro para una posible ampliación del modelo. Durante el análisis de muestras es importante registrar la distancia de Mahalanobis a la muestra vecina (NH). Usando el valor de NH pueden crearse subgrupos de muestras con características espectrales similares dentro del conjunto global de muestras. Este parámetro tiene gran interés cuando se dispone de un set de muestras demasiado amplio. Seguidamente, una muestra de cada subgrupo es elegida para representar a este. De esta manera puede conseguirse un submuestreo representativo del set global de muestras (Infrasoft International LLC, 2000).

8.3. Análisis cuantitativos utilizados

8.3.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS)

La regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) es un método de análisis quimiométrico cuantitativo habitual en análisis multivariante. Se basa en que la información contenida en las variables medidas se puede concentrar en un número menor de variables sin pérdida de información relevante. La regresión se realiza con estas nuevas variables, no con los datos originales, simplificando el modelo de calibración y la interpretación de los resultados (Brereton, 2003).

El método PLS de calibración es útil para resolver problemas de calibración que contienen un número elevado de variables y relativamente pocas muestras basándose en una reducción de variables. Éste es el caso de técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía en el infrarrojo cercano, infrarrojo medio o Raman. Las nuevas variables creadas, denominadas variables latentes, factores o componentes, son combinación lineal de las variables originales.

Durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de los datos espectroscópicos (matriz X), como la información contenida en la matriz de datos de referencia (matriz Y); teniendo en cuenta ambas informaciones, el método reduce el impacto de grandes pero irrelevantes variaciones en la matriz X en el calibrado, se busca además la máxima variabilidad en la matriz X y la mayor correlación con la matriz Y (Höskuldsson, 1996). Además, PLS realiza la regresión en un espacio ortogonal, evitando los problemas derivados de la colinealidad entre las variables, el centrado de los datos se realiza en las matrices X e Y .

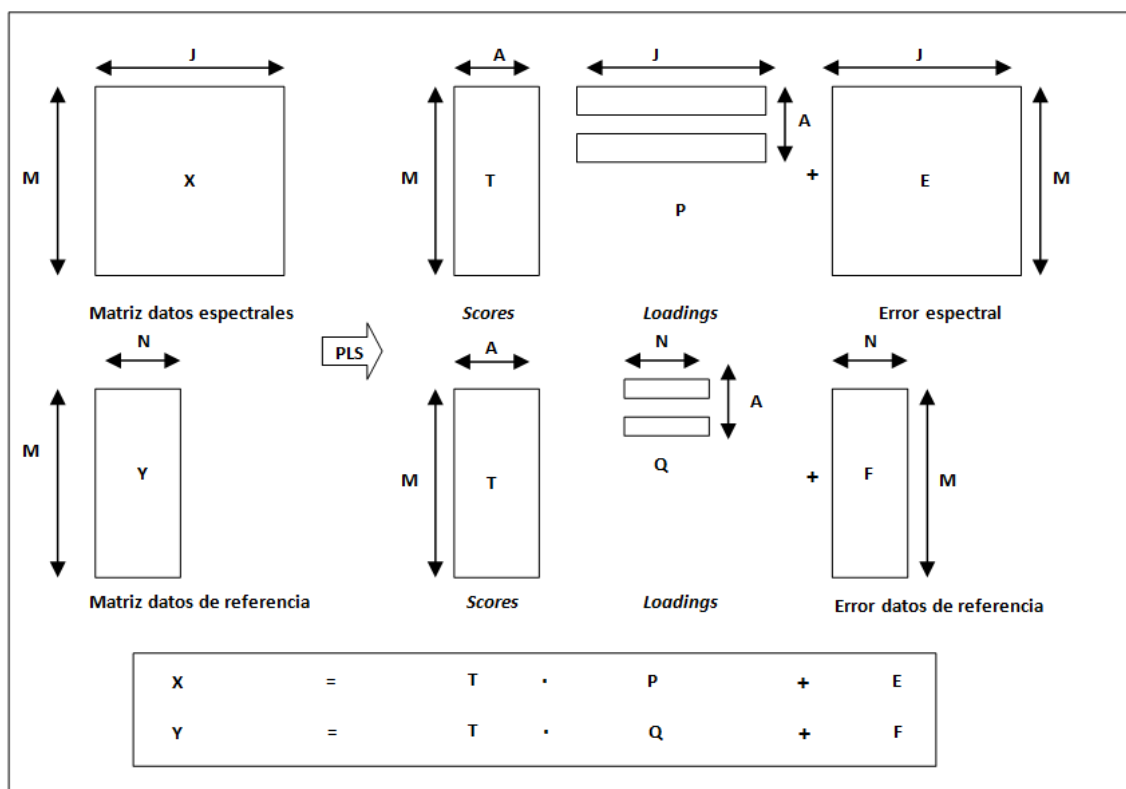


Figura 12. Esquema general de obtención de modelos PLS

En la Figura 12 se observa la descomposición de la matriz espectral y la que contiene los parámetros a modelar (X e Y) mediante PLS, siendo T , matriz de las puntuaciones (*scores*), el nexo común entre ambas. Las matrices P y Q representan los pesos (*loadings*), mientras que las matrices E y F representan los errores o residuales de la descomposición de las diferentes matrices. El número de muestras corresponde a M ; A es el número de variables latentes obtenidas y N indica el número de parámetros a modelar (Brereton, 2003; Vandeginste et al., 1998).

En la matriz Y , el número de columnas (N) representa el número de parámetros a modelar, si $N = 1$ se estaría modelando para un único parámetro, dando lugar al denominado PLS 1. Sin embargo si N toma un valor distinto a la unidad se estarían modelando varios parámetros de forma simultánea, dando lugar al denominado PLS 2.

En esta memoria se ha elegido el método MPLS (*Modified Partial Least Squares*), un PLS modificado. La modificación reside en que los residuales de los espectros a cada longitud de onda (obtenidos después de calcular cada factor, variable latente o componente) se estandarizan, es decir, se dividen por la desviación estándar de los residuales a cada longitud de onda, antes de calcular el siguiente factor o variable latente; lo que hace a este algoritmo más estable y preciso que un PLS normal (Infrasoft International LLC, 2000). Al modelar uno a uno los parámetros se trata de una modificación de un algoritmo PLS 1.

El objetivo de la calibración es obtener unos parámetros que permitan calcular la concentración en futuras muestras, de forma que el residual (diferencia entre el valor de referencia y el predicho) de los datos calculados sea el menor posible. Teniendo en cuenta esto, se evaluará la capacidad de predicción del modelo. Se intenta que los primeros factores o variables latentes contengan la mayor información para la predicción de las muestras. La elección del número de factores o variables latentes se puede realizar de diversas formas; una de las más extendidas es mediante la validación cruzada, procedimiento por el que el conjunto original se divide en varios grupos de forma que se utiliza un grupo para comprobar los resultados (validar) y el resto para construir el modelo, dejando cada vez un grupo fuera, el proceso se repite tantas veces como subgrupos se formen. De esta manera se evitan los sobreajustes, atendiendo al valor del error estándar de validación cruzada (SECV) que, de forma aproximada, se puede decir que es equivalente al error estándar de predicción (SEP) de 10 muestras elegidas al azar (Brereton, 2003; Vandeginste, et al., 1998).

En el proceso de elección del número de factores o variables latentes se comienza por establecer un SECV mínimo y, a partir de éste, se calcula el máximo SECV aceptable (5% superior al mínimo). Se identificará el SECV que con el menor número de factores o variables latentes sea inferior al máximo SECV aceptable, eligiéndose ese número de factores o variables latentes para desarrollar el modelo.

Durante este proceso también son detectadas muestras con altos residuales, diferencias entre el valor de referencia y el predicho. Se utiliza el criterio T , de forma que aquellas muestras cuyo residual dividido por el SECV del proceso supere el valor de 2.5 serán eliminadas del conjunto de calibración.

$$T = \frac{\text{residual}}{\text{SECV}}$$

Este procedimiento se repite dos veces para obtener finalmente el modelo. Algunos de los parámetros que se obtienen de la ecuación de calibración son:

- RSQ: coeficiente de correlación múltiple; se utiliza para medir el grado con el que el calibrado ajusta los datos.

$$RSQ = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{teo_i} - \bar{y})^2} \right)$$

- SEC: error estándar de calibración.

$$SEC = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N - p - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- *BIAS*: se define como la media de los residuales, siendo éstos la diferencia entre el valor del laboratorio (y_{cal_i}) y el valor predicho (\hat{y}_{teo_i}).

$$residual, f_{ij} = (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})$$

- *SECV*: error estándar de validación cruzada.

$$SECV = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- Intervalo de aplicabilidad: valores máximo y mínimo del parámetro de referencia para los cuales se puede utilizar la ecuación.

En estas ecuaciones y_{cal_i} e \hat{y}_{teo_i} son, respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las i -muestras, \bar{y} es el valor medio de los datos calculados, N es el número de muestras utilizadas en el calibrado y p es el número de factores de la regresión.

Una vez obtenido el modelo, se puede proceder a la *validación interna* mediante la predicción de los valores del parámetro de referencia en las mismas muestras que finalmente forman parte del modelo. Algunos de los parámetros que se utilizan para estimar la bondad del modelo son:

- *RSQ*: obtenido al realizar una regresión entre los valores de referencia y los predichos mediante los datos espectroscópicos.

- *SEP*: error estándar de predicción.

$$SEP = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- *SEP(C)*: error corregido por el *BIAS*.

$$SEP(C) = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

En estas ecuaciones y_{cal_i} e \hat{y}_{teo_i} son, respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las i -muestras y N es el número de muestras utilizadas para realizar la validación interna.

Además, para comprobar la robustez del modelo de calibración, se realiza una *validación externa*, aplicando las ecuaciones a un conjunto de muestras que no pertenecen al colectivo de calibración. Algunos de los parámetros que se pueden evaluar son:

- Media de los residuales.
- Porcentaje de error respecto al valor de referencia.
- RMSE: error cuadrático medio (*root mean standard error*).

$$RMSE = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}}$$

En esta ecuación y_{cal_i} e \hat{y}_{teo_i} son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las i -muestras y N es el número de muestras utilizadas para realizar la validación externa. La fórmula es la misma que se emplea en validación interna (para el SEP), pero aplicada a muestras que no pertenecen al colectivo de calibración. La utilización del término SEP para referirse a este parámetro en validación externa se puede encontrar de forma habitual en la bibliografía, indicando que se refiere a dicho tipo de validación.

OBJETIVOS GENERALES



OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo pretende dar respuesta a la demanda de estrategias enológicas sostenibles, alternativas a la vinificación tradicional, para hacer frente al problema de inestabilidad cromática de los vinos tintos. Para ello, se evaluará mediante técnicas espectroscópicas la aptitud fenólica de la uva de vinificación y el potencial de la viruta cruda de madera de roble, subproducto de tonelería, como coadyuvante de vinificación.

En concreto se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Conocer el efecto que tiene la adición de chips tostados de madera de roble como fuente de copigmentos en la extracción de compuestos antociánicos en hollejo de uva tinta clasificada como uva con bajo contenido extraíble, predicho a partir de un modelo desarrollado previamente por análisis de imagen hiperespectral NIR.
- Desarrollar métodos rápidos y no destructivos mediante análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano para la estimación del contenido total y contenido extraíble de fenoles totales y flavanoles en semillas de uva tinta y el contenido fenólico extraíble en viruta cruda de roble.
- Evaluar la viabilidad del uso de un dispositivo portátil miniaturizado de espectroscopía de infrarrojo cercano, MicroNIR™, para la estimación *in situ* del contenido fenólico extraíble en hollejos de uva tinta y virutas crudas de roble.
- Estudiar mediante espectroscopía vibracional (espectroscopía en el infrarrojo medio y Raman) y microscopía electrónica de barrido la relación existente entre la estructura de la pared celular y la extractabilidad de compuestos fenólicos en virutas de roble.
- Determinar, en situaciones reales de vinificación en tinto, el efecto de la adición post-fermentativa de viruta de madera cruda, sobre la composición química y la calidad cromática de vinos tintos de variedad Syrah.

GENERAL OBJECTIVES

The main aim of this work is to meet the demand for sustainable oenological strategies, alternatives to traditional winemaking, to cope the problem of chromatic instability of red wines. For this purpose, the phenolic capability of grapes and the suitability of raw oak wood shavings, cooperage byproduct, as processing aids, are evaluated by spectroscopic analysis tools.

In particular, the following specific aims have been proposed:

- To evaluate the influence of oak wood chips, as copigment sources, on the anthocyanin extraction from red grape skins. Those grapes were previously classified by near infrared hyperspectral image analysis as low-extractable anthocyanin grapes.
- To develop fast and non-destructive methods using near infrared hyperspectral imaging for the screening of total content and extractable content of total phenols and flavanols in red grape seeds and total phenolic content in oak wood shavings.
- To check the feasibility of a portable micro near infrared spectroscopy device, MicroNIR™, for *in situ* screening of extractable polyphenolic content in red grapes and raw oak wood shavings, cooperage byproduct.
- To evaluate the relationship between cell wall structure and the extractability of phenolic compounds from oak wood shavings, cooperage byproduct, by vibrational spectroscopy (Fourier transform infrared and Raman) and scanning electron microscopy.
- To assess, in a real red vinification process, the effect of post-fermentative addition of raw wood shaving, as cooperage byproduct, on chemical composition and chromatic quality of Syrah red wines.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MUESTRAS

1.1.Uva

Se han utilizado muestras de uva tinta de dos viñedos pertenecientes a la región del Condado de Huelva (Andalucía, España). En concreto, se han tomado uvas de dos variedades de *Vitis vinifera* L., Tempranillo y Syrah. La variedad Tempranillo es originaria del valle del Ebro (Rioja y Aragón) aunque su cultivo se encuentra ampliamente extendido por el resto de las regiones vitícolas españolas. Por su parte, Syrah es una variedad de uva tinta, procedente del valle del Ródano, conocida por su fácil adaptación a condiciones de clima cálido como las que se dan en la zona (Gordillo, et al., 2012).

Se llevaron a cabo muestreos específicos para los diferentes estudios en los que se utiliza la uva como matriz pero en todos ellos se ha mantenido una metodología de muestreo similar siguiendo una modificación del método propuesto por Bergqvist, et al. (2001): en cada parcela se eligieron y marcaron cuatro hileras de vides separadas entre sí y de los extremos de la parcela por al menos tres hileras más. De esta forma se pretende cubrir la mayor parte de cada viñedo para considerar la posible heterogeneidad entre distintas zonas. Se tomó un grano de uva por cada planta, teniendo la precaución de tomar de distintas partes del racimo (zonas inferior, superior y media) y cortando el pedicelo para evitar procesos oxidativos tras el muestreo. Con el objetivo de evitar la recogida de muestras poco representativas solo se recogió uva a partir de la quinta vid en cada hilera. Para reducir la influencia de la orientación solar, el muestreo se realizó en las zonas de solana y umbría de cada hilera (Figura 13).

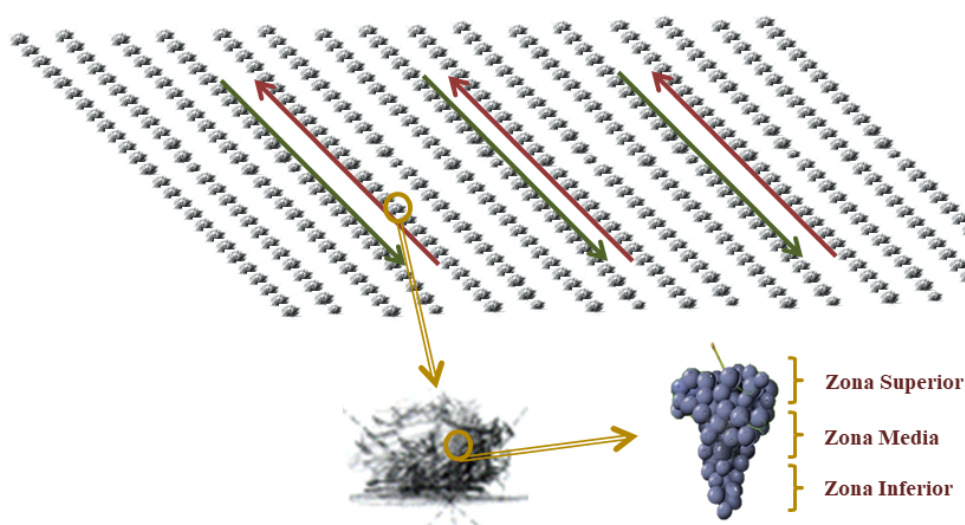


Figura 13. Esquema de muestreo de uva

1.2. Vino tinto

Para el ensayo de vinificación experimental realizado en esta memoria los vinos fueron elaborados a partir de uva tinta *Vitis vinifera* L. de variedad Syrah, cultivada en un viñedo de la región del Condado de Huelva, correspondiente a la campaña de vendimia 2016. Los vinos fueron elaborados en la bodega experimental que el grupo de investigación tiene en la Bodega “Cooperativa Nuestra Sra. Del Socorro” en Rociana del Condado (Huelva), siguiendo el método tradicional de vinificación en tinto y procurando que las condiciones de vinificación fueran similares en todos los vinos.

Para su elaboración, la masa de vendimia (uvas despalilladas y trituradas) se distribuyó en seis tanques de 220 litros de capacidad donde se desarrolló la fermentación. Durante esta fase, se hicieron bazuqueos una vez al día. Pasado este tiempo, los vinos fueron descubados a nueve depósitos de acero inoxidable de 50 litros de capacidad para llevar a cabo tres tratamientos post-fermentativos, por triplicado:

- Vinos elaborados por vinificación tradicional (sin adición post-fermentativa), como vino de control (3 depósitos).
- Vinos con 30 días de maceración post-fermentativa con viruta cruda de roble americano, subproducto de tonelería, agregando 12 g L⁻¹ de virutas (3 depósitos).
- Vinos con doble maceración post-fermentativa: adición de 12 g L⁻¹ de virutas (30 días) y una segunda adición de 12 g L⁻¹ de virutas (30 días) una vez eliminada la primera adición (3 depósitos).

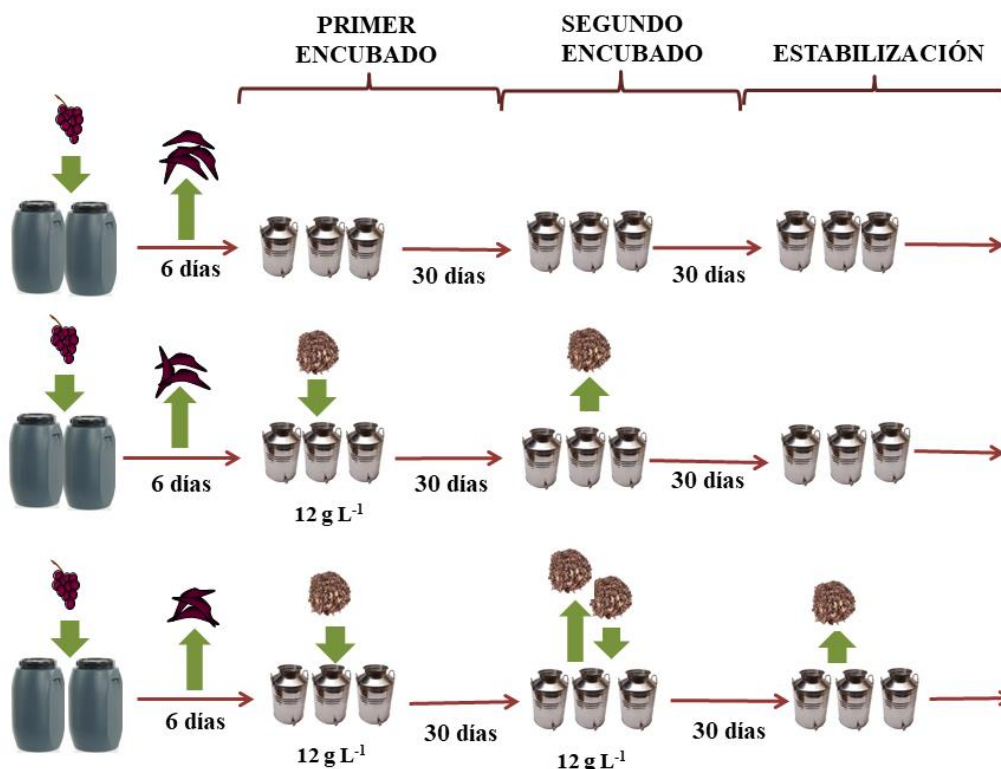


Figura 14. Esquema del proceso de vinificación experimental

Simultáneamente a la adición de virutas, se inocularon bacterias de ácido láctico para estimular el desarrollo de la fermentación maloláctica. Los vinos se mantuvieron en tanques de acero inoxidable hasta el final de la maceración post-fermentativa y durante el proceso de estabilización. La elaboración del vino fue cuidadosamente seguida analizando muestras de vino de forma periódica desde un punto de vista enológico.

Para cada vino elaborado, se tomaron muestras en diferentes momentos de la vinificación, hasta el momento de su embotellado. Los resultados del seguimiento analítico de este ensayo se describen en el Capítulo 7 de esta memoria.

1.3. Madera de roble, subproducto de tonelería

En parte de los ensayos realizados en esta memoria se ha utilizado viruta cruda de roble americano (*Quercus alba* L.), subproducto de tonelería, suministrada por Tonelería Salas S.L. (Bollullos Par del Condado, Huelva, España).

Una vez recibida en la tonelería, la madera se somete a un proceso de secado natural al aire libre durante, aproximadamente, 24 meses. A continuación, antes del ensamblaje, se hace necesario dar forma a los listones de madera, que deberán presentar su medida definitiva, la cara

externa alisada y curvada la interna, los extremos estrechados y los cantos en bisel. Para ello, la madera se somete a procesos de serrado (A y B) y cepillado (C) en dirección longitudinal a las fibras. Para fabricar los fondos de las barricas se unen varias duelas y se sierran en forma circular. Los bordes de los fondos se cepillan (D), en este caso en dirección transversal a las fibras, para conseguir una superficie en bisel y alisada que permita un ensamblaje correcto.

Durante estas etapas iniciales del proceso de elaboración de las barricas se generan las virutas de madera (A, B, C y D) que son utilizadas en los diferentes estudios de esta memoria. Todas las muestras utilizadas son muestras de madera cruda, es decir, han sido generadas antes del tostado de las duelas.

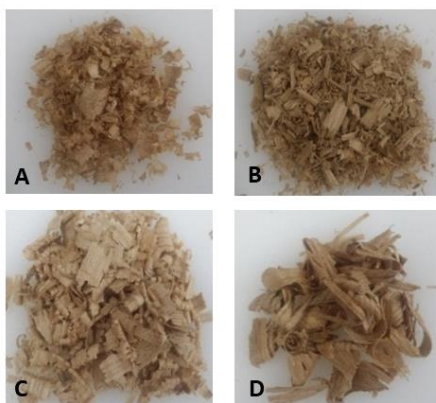


Figura 15. *Viruta de madera cruda de roble americano, subproducto de tonelería, generada en diferentes etapas del proceso de fabricación de las barricas (A, B, C y D)*

Tras la recepción, las muestras fueron tamizadas utilizando dos tamices de luz de malla de 2 mm y 10 mm colocados en tándem. Solo se utilizaron en los ensayos la fracción de muestra retenida entre ellos. Finalmente, las muestras se colocaron en bolsas herméticas y se almacenaron en un lugar seco hasta la realización de los correspondientes análisis.

Las particularidades del muestreo de los diferentes estudios que utilizan viruta de roble se detallan en los capítulos correspondientes.

2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

2.1. Análisis de imagen hiperespectral

2.1.1. Material y equipos

- Cámara Xenics® XEVA–USB InGaAs (320 x 256 píxeles).
- Espectrógrafo Specim ImSpector N17E Enhanced.
- Lámparas halógenas wolframio–yodo 70 W (PRILUX®).
- Estándar de reflectancia difusa Spectralon®.
- Ordenador Pentium IV–2.66 GHz. Windows XP.
- *Software SpectralDAQ v. 3.62.* (Spectral Imaging Ltd.)

2.1.2. Adquisición de imágenes hiperespectrales

Para la adquisición de los datos hiperespectrales, se ha usado un sistema de imagen hiperespectral (Infaimon S.L., Barcelona, España) compuesto por fuente de iluminación, escáner, sistema óptico, espectrógrafo, cámara y ordenador. La Figura 16 muestra un esquema del montaje de este sistema para la adquisición de datos hiperespectrales.

La cámara hiperespectral es el equipo compuesto por las partes d, e, f y g de la Figura 16 y proporciona una imagen que contiene, para cada píxel, el espectro en la región de infrarrojo cercano (NIR) desde 900 a 1700 nm con una resolución de 3.25 nm. La muestra se sitúa en la parte inferior del equipo, sobre una bandeja de polietileno (b). Una estructura (a) soporta el equipo y las fuentes de iluminación (c), dirigidas hacia la muestra con un ángulo de incidencia de 45°. De esta forma se consigue disminuir la componente especular de la reflectancia y maximizar la componente difusa. Las fuentes de iluminación deben permanecer encendidas durante al menos 10 minutos antes del comienzo de las medidas para su correcto funcionamiento y estabilización. La luz reflejada por la muestra llega a un escáner (d) que permite recoger diferentes zonas espaciales de la muestra con la ayuda de un espejo giratorio. El haz de luz reflejado por el espejo se dirige en cada momento a través del sistema óptico (e), donde una lente focaliza la luz sobre el espectrógrafo (f) y ésta se descompone según las diferentes longitudes de onda. La cámara (g), que cuenta con un sensor del tipo InGaAs, recoge estos datos y los envía al sistema informático (h). El sistema informático compone el hipercubo, es decir, el archivo con la información espacial (x e y) y espectral (λ) de la muestra.

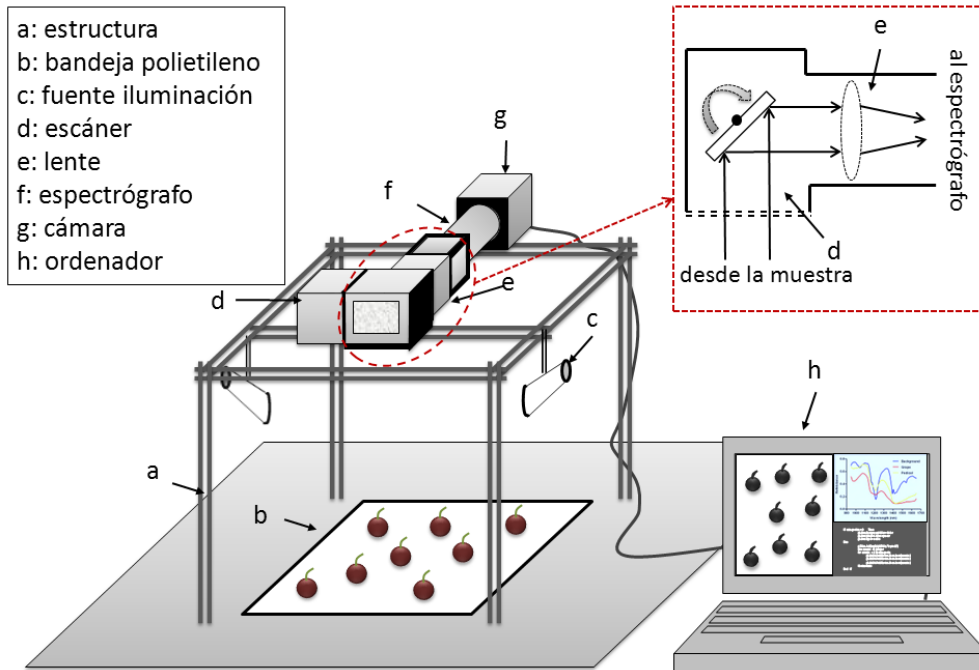


Figura 16. Representación esquemática de la cámara hiperespectral utilizada.

Las imágenes son registradas usando una frecuencia de adquisición de líneas (*frames*) de 50 Hz y un tiempo de exposición de 9 ms. Todo el sistema está gobernado por el *software* SpectralDAQ v. 3.62, (Spectral Imaging Ltd, 2010).

Los archivos recogidos contienen las reflectancias absolutas de cada píxel. Para relativizarlos y poder comparar las medidas entre distintas fechas, e incluso entre diferentes equipos, se realiza una calibración de la reflectancia de doble punto. Esta calibración se realiza gracias a la adquisición de la imagen hiperespectral de un blanco de referencia (Spectralon®, NH, EE.UU.) y de la corriente oscura del equipo. A cada una de las imágenes tomadas se le aplica el siguiente algoritmo, pixel a pixel, para pasar de reflectancias absolutas a reflectancias relativas:

$$R = \frac{S - D}{W - D}$$

Siendo R la reflectancia corregida o relativa y S , W y D las reflectancias absolutas de la muestra, del blanco de referencia y de la corriente oscura respectivamente.

2.1.3. Segmentación de las imágenes hiperespectrales

En la mayoría de los casos, los hipercubos generados en análisis de imagen hiperespectral contienen tanto información de interés, o perteneciente a la muestra, como información no relevante. Es posible seleccionar manualmente las zonas de cada hipercubo que contienen

información de interés con el objetivo de tener en cuenta únicamente los datos espectrales de estas zonas. Sin embargo, sería un proceso tedioso para cuando se mide un gran número de muestras, como es el caso de los estudios recogidos en la presente memoria. La selección de las zonas que contienen información de interés puede automatizarse mediante algoritmos informáticos, lo que se conoce como segmentación.

Para segmentar las imágenes hiperespectrales se han utilizado modificaciones de los métodos descritos en Hernández-Hierro, et al. (2013) y Rodríguez-Pulido, et al. (2014). Mediante análisis discriminante lineal por pasos hacia adelante se seleccionaron las longitudes de onda que tienen más poder discriminante para diferenciar entre el fondo y la muestra, y se calcularon la función o funciones discriminantes. Seguidamente, estas funciones fueron implementadas en Matlab® R2012b (The MathWorks, 2012), mediante un algoritmo que permitió la automatización de la segmentación de las imágenes. Este algoritmo tiene como objetivo clasificar cada píxel de la imagen hiperespectral en dos clases (muestra o no muestra) usando los valores de reflectancia de las longitudes de onda seleccionadas. Finalmente el algoritmo calcula, para cada imagen, el espectro de reflectancia medio de los píxeles clasificados como muestra, le aplica la transformación $\log(1/R)$ y combina todos los espectros obtenidos para las diferentes muestras en una matriz espectral.

2.2. Espectroscopía portátil

2.2.1. Material y equipos

- Espectrómetro MicroNIR™ Pro Lite 1700 (VIAVI) (Santa Rosa, EE.UU.)
- Cable USB
- Accesorio protector con ventana de zafiro antirreflejante
- Soporte para viales
- Estándar de reflectancia difusa Spectralon®
- Vial con estándar de reflectancia difusa
- Viales de vidrio de 5 mL
- Tablet PC iRULU. Windows 10.
- *Software* MicroNIR™ Pro v.2.2 (VIAVI)



Figura 17. Espectrómetro MicroNIR Pro Lite 1700 y accesorios de medida

2.2.2. Adquisición de datos espectrales

Para la adquisición de parte de los datos espectrales registrados en esta memoria se ha utilizado un espectrofotómetro NIR portátil (MicroNIR™ Pro Lite 1700), un dispositivo creado y diseñado por la empresa VIAVI (Santa Rosa, CA, EE.UU.) que permite medir reflectancia difusa y/o transmitancia en la región NIR del espectro electromagnético, si bien, y esto es lo que le diferencia de otros espectrómetros, posee la peculiaridad de un diseño compacto, sin partes móviles y dimensiones muy reducidas.

Este dispositivo incorpora tecnología óptica de alta precisión utilizando como elemento dispersivo un filtro lineal variable de película delgada (LVF). Se trata de un filtro paso banda de Fabry-Perot, cuyo revestimiento se dispone intencionadamente en forma de cuña en una dirección y, como resultado del espesor variable de la película, la longitud de onda transmitida a través del filtro varía linealmente en la dirección de la cuña. El LVF está directamente acoplado a un detector de barrera de diodos de InGaAS de 128 píxeles que cubre el rango espectral entre 908 y 1676 nm con una resolución espectral de 6.2 nm. El LVF hace que cada píxel del detector responda a una longitud de onda diferente.

Este núcleo espectroscópico ultracompacto está acoplado con electrónica de lectura miniaturizada y un sistema de iluminación difusa compuesto por dos lámparas de tungsteno. La unidad se alimenta a través de un puerto USB y posee un peso de 64 g y un diámetro de 50 mm.

En la Figura 18 se muestra un esquema del diseño y principio de funcionamiento del MicroNIR.

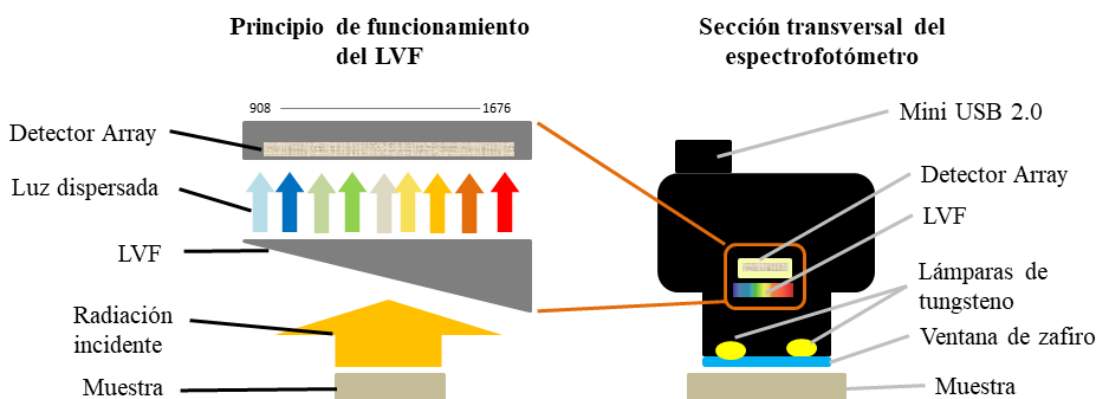


Figura 18. Esquema del diseño y funcionamiento del espectrómetro MicroNIR, adaptado del manual de usuario del equipo

En el modo de reflexión difusa dos lámparas de tungsteno integradas iluminan una región de la muestra que tiene aproximadamente 3 mm de diámetro, a una distancia de 3 mm del instrumento. La radiación reflejada difusa se recoge y se dirige nuevamente al motor espectral, donde es leída y transformada por la electrónica del equipo para ser mostrada, en forma de espectro, en la pantalla conectada al equipo vía USB.

Los espectros se registran usando el software MicroNIR™ Pro v.2.2 (VIAVI, Santa Rosa, California, USA). Antes de cada registro, es necesario realizar una calibración automática de doble punto usando un material cerámico Spectralon® como referencia blanca (100% de reflectancia), mientras que la corriente oscura (0% de reflectancia) se registra al aire, situando el dispositivo a no menos de 0.5 metros de cualquier objeto.

En las dos aplicaciones en las que se ha utilizado este equipo en la presente memoria, las medidas se han realizado utilizando un accesorio protector con ventana de zafiro que facilita la medida.

2.3. Espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR–FTIR)

2.3.1. Material y equipos

- Espectrómetro Spotlight 400 FTIR Perkin Elmer® (MA, EE.UU.).
- Detector *High-quality MCT* (mercurio, cadmio y telurio) de amplio intervalo espectral.
- Accesorio para medidas de reflectancia total atenuada (ATR).
- Accesorio para medidas de imágenes ATR.
- *Software Spectrum 10™*.

2.3.2. Medidas ATR–FTIR

La adquisición de espectros ATR–FTIR se realizó utilizando el espectrómetro Perkin Elmer® (MA, EE.UU.) Spotlight 400N FTIR junto con el accesorio universal para medir reflectancia total atenuada (ATR). Este accesorio proporciona una superficie de medida plana de diamante que permite comprimir la muestra para asegurar una correcta superficie de contacto durante la medida. Usando este accesorio, el haz infrarrojo se proyecta para que atraviese el cristal de diamante, que tiene un elevado índice de refracción. La onda evanescente llega hasta la muestra, en íntimo contacto con el cristal, con la que interacciona produciéndose la absorción de parte de la energía, mientras que la otra parte es reflejada hasta la cara interna del cristal que, de nuevo, la refleja hasta la muestra, donde vuelve a ocurrir la absorción, y así sucesivamente. Este avance en zigzag, produce la atenuación del haz hasta que, finalmente, llega al detector.

Se trata de un método muy versátil que permite la medida de muestras líquidas y sólidas sin prácticamente preparación de las mismas. De esta forma, el accesorio ATR permite que la interacción entre la radiación electromagnética y la muestra no sea puntual, si no que se distribuya por toda la superficie de contacto.

El equipo cuenta con un detector *High-quality MCT* basado en semiconductores a base de mercurio, cadmio y telurio, modificando el dopaje del mismo para ampliar su intervalo de sensibilidad, pudiendo medir desde 580 cm^{-1} a 7800 cm^{-1} . Sin embargo, el intervalo de medida más utilizado es desde 600 a 4000 cm^{-1} , donde el detector tiene una mayor sensibilidad y donde aparecen la mayoría de las absorciones debidas a vibraciones fundamentales de los enlaces más comunes en muestras biológicas.

Para la realización de los estudios descritos en la presente memoria, los espectros se obtuvieron realizando 8 escaneos en el intervalo comprendido entre 650 y 4000 cm^{-1} , con una resolución

espectral de 4 cm^{-1} . Las muestras se fijaron en el accesorio ATR controlando que la presión aplicada fuera la misma para todas ellas. Además, se midió el espectro de fondo (aire) y el equipo lo sustrajo de forma automática de todas las medidas.

2.3.3. Medidas de imágenes ATR-FTIR

Para la adquisición de las imágenes ATR-FTIR se utilizó el mismo espectrómetro Perkin Elmer® (MA, EE.UU.) Spotlight 400N FTIR pero en este caso adaptado con un accesorio de imágenes ATR, un cristal de germanio con índice de refracción de 4.0 y dimensiones de $\sim 600\text{ }\mu\text{m} \times 600\text{ }\mu\text{m}$. Este accesorio proporciona una superficie sobre la que es posible comprimir la muestra para asegurar una correcta superficie de contacto durante la medida y permite la recolección de imágenes ATR de un área de muestra identificada previamente de forma visual con microscopio. Para asegurar un buen contacto óptico durante la recolección de datos, el accesorio incluye un mecanismo que aplica una fuerza de compresión constante y controlable entre la muestra y el cristal ATR.

Este equipo permite analizar grandes áreas de muestra en minutos o segundos en lugar de horas. Su alta sensibilidad permite detectar las muestras más pequeñas, mientras que su velocidad mejora el tiempo de resolución de problemas, extendiendo así el análisis IR a aplicaciones con un rango de medida de 4500 cm^{-1} a 720 cm^{-1} .

Las imágenes espectrales se adquirieron en el intervalo espectral entre 750 y 4000 cm^{-1} , en una región de $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ del cristal ATR, con un tamaño de píxel de $6.25\text{ }\mu\text{m} \times 6.25\text{ }\mu\text{m}$, 4 escaneos por píxel y una resolución espectral de 8 cm^{-1} . Para realizar la medida, el cristal ATR se colocó suavemente en contacto con la muestra utilizando la presión suficiente para garantizar un buen contacto entre la muestra y el cristal pero evitando el deterioro de la misma. El espectro de fondo se adquirió en ausencia de muestra y evitando el contacto entre el cristal y el soporte.

Cada píxel de la imagen registrada corresponde a un espectro de alta calidad y al utilizar las rutinas del *Software Spectrum 10™* integrado de Spotlight, las imágenes registradas son imágenes que muestran rápidamente la distribución de los diferentes componentes de las muestras a partir de las diferencias espectrales entre los píxeles y por tanto eventuales diferencias químicas.

2.4. Espectroscopía Raman

2.4.1. Material y equipos

- Espectrómetro Horiba® Jobin-Yvon LabRAM HR800 (CA, EE.UU.)

- Detector CCD de intervalo dinámico de 16 bits, refrigerado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Láser de alta eficacia Horiba® de 785 nm y 300 mW.
- Microscopio dual.
- Objetivos $\times 50$ Olympus®.
- *Software* LabSpec 6 Horiba®.

2.4.2. *Medidas Raman*

La adquisición de espectros Raman se realizó utilizando el espectrómetro Horiba® (CA, EE.UU.) Jobin–Yvon LabRAM HR800. Este equipo cuenta con un microscopio dual que permite seleccionar las distintas zonas de medida y enfocar correctamente la radiación de excitación sobre la muestra. Se utilizó un objetivo $\times 50$ Olympus® (Tokio, Japón). Como fuente de iluminación se usó un láser Horiba® de 785 nm y 300 mW de una alta eficacia en el infrarrojo cercano. Este láser es menos energético que aquellos que emiten en visible, y por tanto produce emisiones Raman menos intensas. Sin embargo, a diferencia de los láseres que emiten en visible, la excitación en el infrarrojo cercano genera un efecto de fluorescencia casi nulo, con lo que los espectros adquiridos usando esta excitación aparecen mejor resueltos. Además, la baja energía del láser reduce el riesgo de destrucción de la muestra por sobrecalentamiento.

La calibración espectral del equipo se realiza para la línea a 520.7 cm^{-1} correspondiente a un modo vibracional del silicio activo en Raman, usando el Material Estándar de Referencia N° 2243 del National Institute of Standards (CO, EE.UU.). La adquisición de espectros se realizó en el intervalo espectral desde 200 a 3600 cm^{-1} con una resolución de ~ 0.9 a 1.6 cm^{-1} utilizando el detector CCD de intervalo dinámico de 16 bits, refrigerado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ mediante efecto Peltier.

3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

3.1.1. Material y equipos

- Microscopio Hitachi® SU 6600 FE-SEM
- Cintas conductivas adhesivas de carbón para microscopía electrónica
- *Software* SEM Data Manager

3.1.2. Medidas de microscopía

Se ha usado un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU 6600 FE-SEM. El reducido tamaño del haz de electrones que incide sobre la muestra en un Field Emission-SEM, menor que en SEM convencional, permitió obtener imágenes de muy alta resolución, revelando detalles en el intervalo de 1 a 5 nm. Dado su carácter no conductor, las virutas de madera se colocaron sobre cintas o parches conductivos de carbón antes de introducirlas en la cámara de muestras. Se utilizó una tensión de aceleración de 2 kV, distancia de trabajo de 30 mm, lente condensadora de 21.0 y corriente de 20 μ A para todas las muestras. Se utilizó el *software* “SEM data manager” para el registro automático de las imágenes, el ajuste de los parámetros de interés y su almacenado en base de datos.

4. MEDIDAS DE COLOR POR COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO. ESPACIO CIELAB

4.1.1. Material y reactivos

- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent® 8453 (Agilent Technologies®) (CA, EE.UU.).
- Cubeta de vidrio de 2 mm (Hellma Analytics)
- Conjunto de filtración de muestras Millipore (Billerica) (MA, EE.UU.), constituido por jeringa, portafiltro y filtros AP20 de 13 mm de diámetro
- Software CromaLab® 2.0

4.1.2. Medida del color

La medida del color de las muestras de vino se ha realizado por Colorimetría Triestímulo, a partir de medidas espectrofotométricas de transmisión dentro del espectro de la radiación electromagnética visible (380-780 nm). La aplicación de la Colorimetría Triestímulo permite obtener los valores triestímulos X, Y, Z, que definen el color de la muestra y que son el punto de partida para calcular el resto de variables colorimétricas de otros espacios de color como CIELAB: L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} y h_{ab}

Antes de realizar la medida de color los vinos fueron filtrados usando un filtro Millipore AP20 de 13 mm de diámetro. Para realizar la medida, la muestra de vino, previamente filtrada, se deposita en una cubeta de vidrio de 2 mm de paso de luz y se registra el espectro de absorción en la región visible por espectrofotometría, frente a agua destilada como blanco de referencia, a intervalos constantes de 2 nm.

A partir de los espectros registrados y utilizando el software de cálculo original CromaLab® (Heredía, Álvarez, González-Miret, y Ramírez, 2004) se obtuvieron los datos de color de cada uno de los vinos analizados en el espacio CIELAB, en concreto, se obtuvieron las coordenadas colorimétricas (a^* , b^*) y los parámetros claridad, croma y tono (L^* , C^*_{ab} y h_{ab}). Este software tiene en cuenta las recomendaciones de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE, 2004): observador estándar de 10° e iluminante estándar D65.

El parámetro colorimétrico diferencia de color (ΔE^*_{ab}), se ha calculado como la distancia euclídea entre dos puntos en el espacio tridimensional definido por L^* , a^* y b^* :

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

5. ANÁLISIS QUÍMICO

5.1. Composición fenólica

5.1.1. Material y reactivos

- Metanol (J.T. BAKER[®]) (PA, EE.UU.).
- Ácido clorhídrico 12M (Panreac[®]) (Barcelona, España).
- Agua desionizada (Milli-Q, Merck Millipore[®]) (Darmstadt, Germany).
- Etanol absoluto (Panreac[®]) (Barcelona, España).
- Ácido tartárico (L+) (Panreac[®]) (Barcelona, España).
- Hidróxido sódico 0.5 M (J.T. BAKER[®]) (PA, EE.UU.).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck[®]) (Darmstadt, Germany).
- Carbonato sódico anhidro (Panreac[®]) (Barcelona, España).
- Patrón de referencia, ácido gálico (Analytical Carlo Erba[®]) (Barcelona, España).
- 4-(dimetilamino) cinamaldehído (DMACA) (Sigma Aldrich[®]) (MO, EE.UU.).
- Patrón de referencia, (+)-catequina (Sigma Aldrich[®]) (MO, EE.UU.).
- Acetonitrilo calidad HPLC (J.T. BAKER[®]) (PA, EE.UU.).
- Ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich[®]) (MO, EE.UU.).
- Patrón de referencia, malvidina-3-O-glucósido, cloruro de oenina (Extrasynthese[®]) (Lyon, Francia).
- Ácido acético (Panreac Quimica SLU, Castellar del Vallès, España).
- Isopropanol HPLC (HiPerSolv[®] Chromanorm, BDHProlabo, VWR International) (Briare, Francia)
- Metanol HPLC (HiPerSolv[®] Chromanorm, BDHProlabo, VWR International) (Briare, Francia)
- Patrón Galocatequina (Sigma Aldrich[®]) (MO, EE.UU.).
- Patrones de elagitaninos no comerciales, aislados y purificados a partir de un extracto de madera de roble.
- Baño de ultrasonidos JP Selecta[®] (Barcelona, España).

- Centrífuga Eppendorf® 5810R (Hamburgo, Alemania).
- Concentrador Plus Eppendorf® (Hamburgo, Alemania).
- Vortex Genius 3 IKA® (Staufen, Alemania).
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent® 8453 (Agilent Technologies®) (CA, EE.UU.).
- Cubetas desechables de plástico de 10 mm de camino óptico Kartell® 1938 (Milan, Italia).
- Balanza analítica METTLER TOLEDO CLASSIC AB204-S (Barcelona, España).
- Liofilizador Telstar® Cryodos -80° (Barcelona, España).
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia HPLC Agilent Technologies® HP 1200 (CA, EE.UU.), equipado con bomba cuaternaria, desgasificador de vacío, compartimento termostatzado para columna, inyector automático y detector de diodos.
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia HPLC Agilent Technologies® HP 1100 (Waldbronn, Alemania)
- Espectrómetro de masas Applied Biosystems API 3200 Qtrap (Darmstadt, Alemania) equipado con fuente de ionización por electrospray y analizador de masas triple cuadrupolo/trampa de iones lineal.
- Columna cromatográfica Zorbax ODS de 4.6 x 250 mm y 4.6 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies®).
- Columna cromatográfica Aqua C18 de 4.6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, CA)
- Viales de inyección para cromatografía (Agilent Technologies®)
- Filtros Nylon 0.45 µm HNWP 04700 Merck Millipore® (Darmstadt, Germany).
- Matraces aforados de 5, 10, 25 mL y 1 L.
- Micropipetas Eppendorf® (Hamburgo, Alemania) de intervalo de volumen 2-100 µL, 0.1-1 mL y 1-10 mL.

5.1.2. Extracciones

Se han llevado a cabo dos tipos de extracciones, según los objetivos planteados en cada ensayo, para determinar el contenido fenólico de las muestras sólidas (hollejos, semillas y virutas de roble). Por un lado se realizaron extracciones parciales para simular las condiciones reales de vinificación y, por otro, extracciones exhaustivas con metanol para conocer la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en las muestras.

Se preparó un medio con características similares al vino (vino sintético), es decir, una disolución en base acuosa con un 12.5% de etanol, 4 g L⁻¹ de ácido tartárico y un pH de 3.6 ajustado con NaOH 0.5M. Las muestras se maceraron en este medio durante 3 días en lugar oscuro, fresco y seco, tras los cuales se utilizó una alícuota del extracto para la realización de los análisis espectrofotométricos o cromatográficos según corresponda.

Para la extracción exhaustiva, las virutas de madera, liofilizadas, fueron extraídas con una disolución acuosa de metanol al 50% y los extractos posteriormente filtrados. En el caso de las semillas, liofilizadas y molidas, la extracción, en disolución acuosa de metanol al 75%, se realizó en baño de ultrasonidos y posterior centrifugación. El proceso se repitió hasta que el extracto resultante quedó incoloro; todos los sobrenadantes se mezclaron y se enrasaron a un volumen fijo. Se usó una alícuota de cada extracto para los análisis espectrofotométricos. En el caso de semillas, la alícuota fue previamente evaporada y reconstituida con agua desionizada.

5.1.3. *Contenido en fenoles totales*

Se ha determinado el contenido en fenoles totales en muestras de vino y en extractos de muestras sólidas (hollejos, semillas y viruta de madera). La determinación se realizó siguiendo el método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Este método se basa en una reacción de óxido-reducción entre el reactivo de Folin y los fenoles presentes en la muestra. El reactivo de Folin Ciocalteu está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que, al reaccionar con los compuestos fenólicos, se reduce a una mezcla compleja de color azulado adecuada para la determinación espectrofotométrica por medida de la absorbancia a 765 nm.

De forma general, a 0.25 mL de muestra se le añadieron 3.75 mL de carbonato de sodio (20% p/v) y 1.25 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu. Esta mezcla se enrasó a 25 mL con agua destilada y, tras dejar que la reacción se completara (2 horas), se midió la absorbancia a 765 nm. Los volúmenes de muestra fueron adecuadamente modificados siempre que fue necesario. Para cada matriz, los fenoles totales se cuantificaron mediante la correspondiente recta de calibrado utilizando como patrón ácido gálico.

5.1.4. *Contenido en flavanoles totales*

Se ha determinado el contenido en flavanoles totales en muestras de vino y en extractos de muestras sólidas (hollejos y semillas de uva). Este análisis se llevó a cabo siguiendo una modificación del método espectrofotométrico descrito por (Vivas, Glories, Lagune, Saucier, y Augustin, 1994). De forma general, según se tratara de vino y extracción exhaustiva o vino sintético, 10 o 20 µL de muestra se mezclaron con 190 o 180 µL de metanol, respectivamente. Se

añadió 1 mL de reactivo DMACA y, tras 10 minutos, se midió la absorbancia a 640 nm. El reactivo DMACA, que se preparó inmediatamente antes de su uso, contenía 0.1% (p/v) de 4-(dimetilamino) cinamaldehído en una disolución HCl:Metanol (1:10, v/v). Los volúmenes de muestra fueron adecuadamente modificados siempre que fue necesario. Los flavanoles totales se cuantificaron mediante una recta de calibrado utilizando (+)-catequina como patrón.

5.1.5. *Determinación del perfil antociánico*

La separación, identificación y cuantificación de los antocianos presentes en las muestras de vino tinto y hollejo de uva tinta se ha realizado mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) siguiendo una modificación del método descrito por M. García-Marino, J. M. Hernández-Hierro, J. C. Rivas-Gonzalo, y M. T. Escribano-Bailón (2010). Previamente a los análisis cromatográficos, tanto los vinos como los extractos provenientes de las extracciones fueron filtrados, utilizando filtros de tamaño de poro 0.45 μm , y diluidos 1:2 con HCl 0.1 M.

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un equipo HPLC Agilent Technologies® HP 1200 (CA, EE.UU.), equipado con una columna cromatográfica Zorbax SB C18 (4.6 mm \times 250 mm, 4.6 μm de tamaño de partícula) y un sistema de detección basado en matriz de diodos. Las fases móviles usadas fueron ácido trifluoroacético 0.1% (v/v) como fase A y acetonitrilo como fase (B). El perfil de elución, expresado en porcentaje de fase B, fue el siguiente: 10% durante 3.25 minutos, desde 10 a 15% durante 12.37 minutos, 15 % durante 5.21 minutos, desde 15 a 18% durante 5.21 minutos, desde 18 a 30% durante 20.84 minutos y desde 30 a 35% durante 5.20 minutos. El flujo de fase móvil utilizado fue de 0.8 mL/minuto y el volumen de inyección de 100 μL . La longitud de onda de detección se fijó en 520 nm y se detectaron hasta un total de 15 antocianos, identificados de acuerdo a sus características espectrales y cromatográficas. La cuantificación de los distintos antocianos se realizó a partir de una recta de calibrado utilizando como patrón malvidina-3-O-glucósido.

5.1.6. *Determinación de elagitaninos*

La determinación de elagitaninos en muestras de viruta de madera se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas siguiendo el método descrito por García-Estévez, Escribano-Bailón, Rivas-Gonzalo, y Alcalde-Eon (2012). Se añadió galocatequina como patrón interno antes del análisis por HPLC-ESI-MS/MS-MRM (análisis de transiciones mediante tecnología *multiple reaction monitoring*).

Los análisis HPLC se llevaron a cabo en un equipo HPLC Agilent Technologies® de la serie Hewlett-Packard 1100 (Waldbronn, Alemania) equipado con una columna cromatográfica Aqua C18 de fase reversa (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm de tamaño de partícula) termostata a 35 $^{\circ}\text{C}$.

Las fases móviles utilizadas fueron una solución acuosa 2.5% (v/v) de ácido acético como fase A, isopropanol como fase B y metanol como fase C. El perfil de elución fue el siguiente: isocrático 100% de A durante 14 minutos a flujo 0.4 mL min⁻¹, de 0.4 a 0.5 mL min⁻¹ durante 1 minuto, de 100% de A a 90% de A, 2% de B, 8% de C durante 5 minutos, desde 90% de A, 2% de B, 8% de C a 60% de A, 8% de B, 32% de C durante 20 min e isocrático 60% de A, 8% de B, 32% de C durante 5 min. La longitud de onda utilizada para el registro de los cromatogramas fue 250 nm y los espectros se registraron de 220 a 600 nm.

Para la detección por espectrometría de masas se utilizó un espectrómetro API 3200 Qtrap Applied Biosystems (Darmstadt, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electrospray, ESI, y un analizador de masas dual trampa iónica lineal-triple cuadrupolo, controlado por el software Analyst 5.1. Las condiciones de medida fueron optimizadas y validadas por García-Estévez, et al. (2012). Se utilizó un análisis de transiciones mediante la tecnología *multiple reaction monitoring* (MRM) para detectar las transiciones correspondientes a los diferentes elagitaninos analizados: castalagina (933/631), vescalagina (933/301), y grandina y roburina E (1065/249); y al patrón interno, galocatequina (305/125).

Para la cuantificación de los elagitaninos individuales se construyó una recta de calibrado para cada uno de ellos (castalagina, vescalagina, grandinina y roburina E), utilizando la relación entre la señal de la transición de cada elagitanino a diferentes concentraciones y la señal de la transición del patrón interno frente a la concentración de elagitanino. Para construir las rectas de calibrado se utilizaron patrones no comerciales aislados y purificados a partir de un extracto de madera (García-Estévez, Escribano-Bailón, Rivas-Gonzalo, y Alcalde-Eon, 2010). Estas rectas de calibrado se usaron para cuantificar los cuatro elagitaninos en todas las muestras después de la adición del patrón interno.

6. QUIMIOMETRÍA

6.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales o PCA se ha aplicado en buena parte de los estudios recogidos en la presente memoria. Según el estudio, el PCA ha tenido los siguientes objetivos:

- Reducir la dimensión de la matriz mediante la creación de variables nuevas (componentes principales) que representen la mayor parte de la variabilidad original y permitan observar agrupaciones o tendencias en las muestras.
- Ordenar las muestras dentro de la matriz espectral y detectar posibles *outliers*, muestras con características espectrales muy distintas al resto, mediante el cálculo de la distancia H de Mahalanobis.
- Reducir el número de muestras mediante la selección de un subconjunto que represente de forma adecuada la variabilidad espectral del conjunto original. Las muestras pertenecientes a este subconjunto serán seleccionadas teniendo en cuenta la distancia de Mahalanobis a muestra vecina (NH).

En los estudios donde se han usado matrices espectrales, el PCA se ha realizado usando el *software* Win ISI® (v1.50) (Infrasoft International LLC, 2000). Este *software* usa un algoritmo especializado en el tratamiento de espectros (con número de variables igual a número de longitudes de onda medidas), con lo que el proceso de cálculo es mucho más ágil que en otros *software*. De forma previa a la aplicación del PCA, los espectros fueron pretratados para minimizar los efectos dispersivos de la radiación electromagnética. Se les aplicó una tipificación de la absorbancia, un suavizado, utilizando para ello un intervalo de 5 puntos, y una segunda derivada calculada también a intervalos de 5 puntos (SNV 2,5,5,1). Concretamente, se ha aplicado en las matrices espectrales que comprenden espectros en el infrarrojo cercano (NIR), en el infrarrojo medio (MIR) o espectros Raman.

El PCA se realizó con el *software* Statistica v.8.0 (StatSoft Inc., 2007, OK, EE.UU.) en los casos en que se usan datos no espectrales como variables. Tal es el caso de matrices constituidas por parámetros de color y contenidos fenólicos totales o extraíbles.

6.2. Regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS)

Se ha utilizado la regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS) para valorar la relación (de forma predictiva) entre una variable dependiente y otras variables independientes. Para la realización de este análisis se ha utilizado el *software* Win ISI® (v1.50), siguiendo el siguiente procedimiento:

Tras la realización del análisis de componentes principales (PCA), que permite conocer la distribución de muestras en el espacio recién creado, determinar *outliers* espectrales ($H > 3$), si existen, y seleccionar subconjuntos de muestras representativas del conjunto inicial, se asocia a cada muestra espectral los datos de referencia, determinados previamente. Con el objetivo de reducir al máximo el error de validación cruzada se probaron distintos pretratamientos espectrales, derivadas y suavizados sobre la matriz espectral de calibración antes de comenzar el cálculo de la regresión.

La selección de muestras se realizó de forma parcialmente guiada, seleccionando aleatoriamente una muestra de cada uno de los grupos espectralmente similares identificados, utilizando el criterio NH, para el subconjunto de calibración y otra para el de validación.

El método MPLS divide el set de muestras de calibración en una serie de subgrupos para realizar una validación cruzada que permite fijar el número de factores de mínimos cuadrados parciales (factores PLS), reduciendo así la posibilidad de sobreajuste (Shenk, et al., 1995) y ayudando a eliminar *outliers* químicos. Al realizar la predicción, las muestras que presentan un error residual alto son eliminadas, permaneciendo aquéllas que presentan un valor de $T \leq 2.5$. El error de validación obtenido en cada muestra se combina en forma de error estándar de validación cruzada (*SECV*).

Finalmente, se realizó una validación externa de los modelos generados utilizando el subconjunto de muestras de validación. De este proceso de validación se obtiene el error estándar de validación externa que permite, junto con otros parámetros, evaluar la bondad de los modelos MPLS calculados.

6.2.1. Aplicación de los modelos desarrollados

Los modelos MPLS desarrollados se aplicaron a muestras externas a éstos con el objetivo de predecir los valores que tendrán los parámetros de interés para las cuales estos modelos fueron creados. La aplicación de un modelo MPLS a nuevas muestras es posible siempre y cuando sus espectros pertenezcan al mismo espacio espectral que los espectros de las muestras que generaron el modelo. Para comprobar que se cumple esta condición, los espectros de las nuevas muestras se descomponen en el espacio espectral generado por el PCA y se calcula la distancia de

Mahalanobis (H) entre cada espectro de estas nuevas muestras y el centro del espacio espectral. Esta distancia tiene que ser menor a 3 unidades para que la nueva muestra pueda ser evaluada por los modelos MPLS desarrollados previamente.

Tras la aplicación de los modelos MPLS a un set de nuevas muestras, se obtuvieron los valores de los parámetros de referencia predichos. Estos valores permiten conocer características de las muestras de forma rápida y no destructiva, que pueden ser aplicadas para el diseño de nuevos estudios. En la presente memoria, este procedimiento se ha aplicado en distintas ocasiones. Bien para conocer la distribución de compuestos fenólicos predichos, extraíbles o totales, en un set de muestras o para conocer contenidos extraíbles predichos de compuestos fenólicos en hollejo de uva y poder clasificar después las muestras según estos contenidos predichos.

6.3. Análisis de la varianza (ANOVA)

En general, el propósito del ANOVA es encontrar diferencias significativas entre las medias, a través de una variable dependiente, cuantitativa, y un conjunto de variables independientes o factores, que son cualitativas. El valor del nivel de significación estadística p representa la probabilidad de error que implica aceptar como válido el resultado observado.

En concreto, se ha utilizado el ANOVA con el objetivo de evaluar la influencia de la adición de fragmentos de madera en etapa fermentativa y postfermentativa sobre el contenido antociánico extraíble de hollejos de uva tinta y sobre la composición fenólica y calidad cromática de vino tinto, respectivamente. Se ha utilizado el software Statistica v.8.0 (StatSoft Inc, 2007) aplicando el test *post hoc* de Tukey para detectar qué grupos son significativamente diferentes, en cuanto a sus valores medios. Se estableció un nivel de significación estadística de $\alpha=0.05$ en todos los análisis en los que se realizó este test.

6.4. Agrupamiento mediante el algoritmo de k-medias

La aplicación de este algoritmo ha permitido agrupar muestras de semilla de uva en dos grupos con distintos niveles de extractabilidad fenólica.

El análisis se desarrolló utilizando el software Statistica v.8.0. Para iniciar el análisis se seleccionaron los centros iniciales de cada grupo de forma que las distancias iniciales entre cada grupo fueran máximas. El algoritmo iterativo continúa asignando cada muestra al grupo cuyo centro sea el más cercano y recalculando los centros al finalizar la asignación. El algoritmo finaliza cuando el reparto de la población de muestras entre los distintos grupos se repite.

6.5. Análisis Discriminante Lineal (LDA)

Se ha aplicado el análisis discriminante lineal a muestras de uva tinta y muestras de semillas de uva con el objetivo de discriminar entre distintos niveles de contenido fenólico extraíble y extractabilidad fenólica de las muestras, respectivamente. En ambos casos las variables independientes utilizadas fueron las puntuaciones obtenidas en el PCA de los espectros NIR de las muestras.

Se ha usado el software SPSS 22.0 (IBM®, 2015) para realizar estos análisis, utilizando la modalidad de análisis por pasos. Ésta selecciona las variables más significativas para la discriminación entre las diferentes categorías usando el estadístico F para evaluar la significancia del cambio en la Lambda de Wilks al añadir o eliminar una variable. La capacidad de predicción se estimó considerando el porcentaje de muestras correctamente clasificadas usando un proceso de validación dejando una muestra fuera (*leave-one-out*) o una validación externa, según el caso.

6.6. Análisis discriminante basado en la regresión por mínimos cuadrados parciales (DPLS)

El análisis DPLS se ha utilizado con el objetivo de discriminar muestras de uva entre los distintos niveles de contenido fenólico extraíble (fenoles totales, flavanoles y antocianos) establecidos previamente.

El software win ISI® (v1.50) se utilizó para llevar a cabo el análisis DPLS y se realizó utilizando, como variables independientes los espectros de los hollejos asignados a los conjuntos de calibración para cada parámetro evaluado obteniéndose los porcentajes de muestras correctamente clasificadas en validación interna. Además, los modelos desarrollados se probaron con los espectros asignados a los conjuntos de validación y se obtuvieron los porcentajes de las muestras clasificadas correctamente en la validación externa.

6.7. Índice de similitud de Pearson

El índice de similitud de Pearson se ha utilizado para discriminar muestras de uva entre los niveles de alto y bajo contenido fenólico extraíble (fenoles totales, flavanoles y antocianos).

Para ello, se calcularon los espectros promedio de las muestras de uva clasificadas previamente como muestras con alto y bajo contenido extraíble del conjunto de calibración atendiendo a datos químicos, obteniéndose, por tanto, dos espectros promedio, uno correspondiente a las muestras de alto contenido fenólico extraíble y otro a las de baja. A continuación, se realizó una regresión lineal entre el espectro de cada muestra y el espectro promedio de la clase de bajo contenido

extraíble y se repitió el mismo procedimiento utilizando el espectro promedio de la clase de alto contenido extraíble, obteniendo para cada muestra dos coeficientes de correlación R, uno para la clase alta y otro para la baja. A partir de este coeficiente se calculó el índice de similitud de Pearson de cada muestra con respecto a las dos clases estudiadas según la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de similitud} = \frac{1}{1 - R^2}$$

Para cada muestra se compararon los dos índices y se clasificaron en el grupo para el que se obtuvo el índice más alto (es decir, contenido extraíble bajo o alto), obteniendo los porcentajes de muestras clasificadas correctamente en validación interna. Por último, se utilizó el conjunto de muestras de validación para obtener los porcentajes de muestras clasificadas correctamente en la validación externa. Este procedimiento se repitió para cada parámetro de referencia (contenido extraíble de fenoles totales, flavanoles y antocianos). El software win ISI® (v1.50) se utilizó para llevar a cabo el análisis. En la Figura 19 se puede observar de forma esquemática el procedimiento realizado en este análisis.

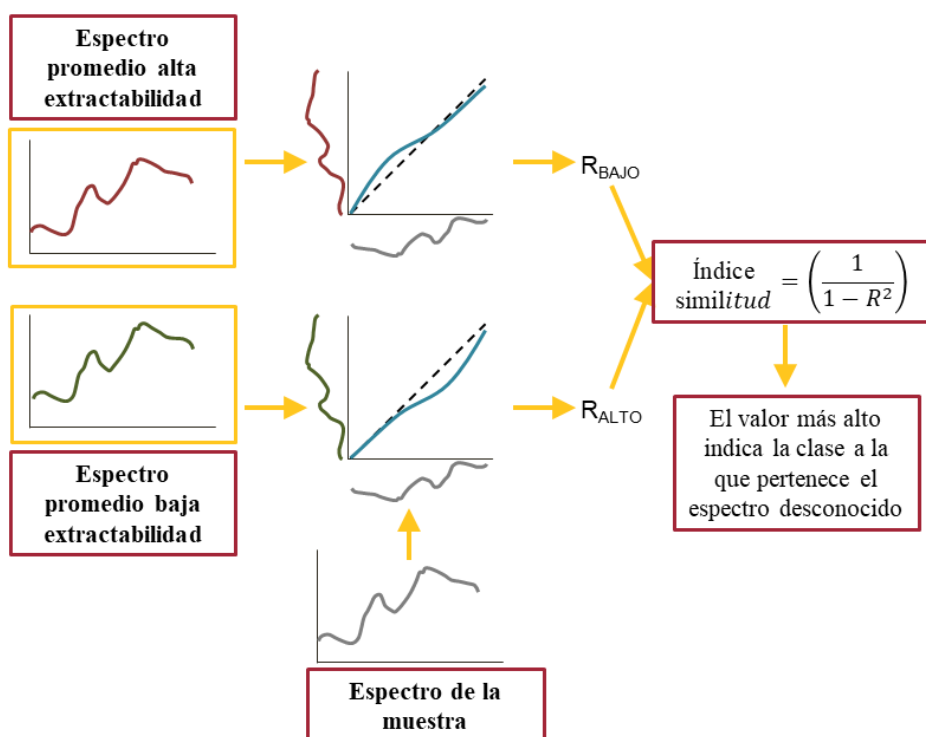


Figura 19. Esquema de obtención del Índice de similitud de Pearson

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO 1: INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE CHIPS DE MADERA DE ROBLE EN LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANOS PROCEDENTES DE HOLLEJO DE UVA CON BAJO CONTENIDO ANTOCIÁNICO EXTRAÍBLE

En: Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Heredia Mira, Francisco José; Hernández Hierro, José Miguel: *Influence of oak wood chips-grape mix maceration on the extraction of anthocyanins from low-extractable anthocyanin content red grapes*. European Food Research and Technology 2018. Vol. 244. Pág. 729–734, <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2999-7>

1. Antecedentes

El color es una de las principales características que definen la calidad de un vino y, por lo general, el primer atributo percibido por los consumidores. Por tanto, el color del vino es un parámetro muy importante enológico si se desea obtener vinos de alta calidad. Los antocianos extraídos del hollejo de la uva son los principales responsables del color de los vinos tintos y sus interacciones con otros compuestos fenólicos, llamados copigmentos, normalmente incoloros, permiten la estabilización del color de los vinos mediante reacciones de copigmentación (Boulton, 2001; Escribano-Bailon, et al., 2012).

Las condiciones climáticas típicas de las regiones cálidas, como Andalucía, dificultan la obtención de vinos tintos de alta calidad especialmente cuando se someten a procesos de envejecimiento (Mira de Orduña, 2010). Esto se debe, fundamentalmente, a que la maduración fenólica y tecnológica de las uvas no ocurre al mismo tiempo y por tanto, en el momento de la vendimia las uvas tienen un alto contenido de azúcar pero cantidades fenólicas insuficientes (Mori, et al., 2005). En estas condiciones, los fenómenos de copigmentación, que contribuyen a la estabilización del color, se ven obstaculizados por la escasez de pigmentos y copigmentos (Trouillas, et al., 2016).

Numerosos estudios demuestran que la adición de copigmentos al vino produce mejoras en sus características cromáticas y en la estabilización del color (González-Manzano, Dueñas, Rivas-Gonzalo, Escribano-Bailón, y Santos-Buelga, 2009; Gordillo, Rodríguez-Pulido, González-Miret, Quijada-Morin, Rivas-Gonzalo, García-Estevéz, et al., 2015). Teniendo en cuenta que la madera de roble es una fuente natural de fenoles (De Rosso, Panighel, Vedova, Stella, y Flamini, 2009), podría considerarse una fuente potencial de copigmentos para usar en vinificación.

A pesar de que en las reacciones de copigmentación suelen estar implicados principalmente compuestos de naturaleza flavanólica, los antocianos del vino también tienen la capacidad de reaccionar directamente con otros compuestos fenólicos cedidos por la madera de roble como,

por ejemplo, los elagitaninos (Chassaing, Lefeuvre, Jacquet, Jourdes, Ducasse, Galland, et al., 2010; Quideau, Jourdes, Lefeuvre, Montaudon, Saucier, Glories, et al., 2005). Las propiedades oxidorreductoras de los elagitaninos hacen que su presencia en el vino influya en la evolución de su color, tanto por su efecto protector frente a la oxidación de los antocianos como por su combinación con estos compuestos que conduce a una mayor estabilidad de los pigmentos (Vivas, et al., 1996).

Sin embargo, la adición de fragmentos de madera de roble como fuente de copigmentos con el objetivo de mejorar o estabilizar el color del vino puede tener también ciertos inconvenientes. En contacto con la madera, el vino sufre una serie de transformaciones que conducen a cambios importantes en el color pero también en el aroma, sabor y astringencia (Glabasnia, et al., 2006; Puech, et al., 1999; Zamora, 2003). Por tanto, la adición de madera puede aportar aromas indeseados, excesivo amargor o astringencia al vino. Además, es posible que los fragmentos de madera adsorban pigmentos antociánicos consiguiéndose así un efecto contrario al deseado.

2. Objetivo

El objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar el efecto que tiene la adición de chips de madera de roble como fuente de copigmentos sobre la extracción de antocianos en hollejo de uva tinta clasificada como uva con bajo contenido extraíble predicho a partir de un modelo desarrollado previamente usando el análisis de imagen hiperespectral NIR .

3. Parte experimental

Este estudio se llevó a cabo a partir de un conjunto original de doscientas uvas de las variedades tintas Syrah y Tempranillo, cuyo contenido extraíble de antocianos había sido previamente predicho a partir del modelo desarrollado por Nogales-Bueno, Baca-Bocanegra, Rodríguez-Pulido, Heredia, y Hernández-Hierro (2015) utilizando el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano. Las uvas se recolectaron en el momento de la vendimia de la campaña 2013. Se recolectaron cien bayas de cada variedad siguiendo un modificación de la metodología descrita por Bergqvist, et al. (2001). Una vez recolectadas, las muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio donde, tras alcanzar la temperatura ambiente, fueron sometidas al análisis de imagen hiperespectral. A continuación, se separaron los hollejos de cada uva, se pesaron y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los correspondientes análisis químicos.

Teniendo en cuenta los resultados del modelo hiperespectral desarrollado, según los cuales el contenido antociánico extraíble predicho es menor para las uvas de variedad Syrah que para las de variedad Tempranillo, se consideró la variedad Syrah como la más interesante para la

evaluación del efecto de la adición de copigmentos. Las muestras del subconjunto de variedad Syrah fueron ordenadas de acuerdo con el contenido extraíble predicho de antocianos y separadas en dos grupos: bajo y alto contenido extraíble predicho; usando la mediana como valor de corte para la clasificación (1.8 mg g^{-1} hollejo). Finalmente, para realizar el ensayo, se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras del grupo de bajo contenido extraíble predicho.

El hollejo de cada una de las 10 uvas seleccionadas se dividió en dos partes aproximadamente iguales, y se maceraron de forma individual durante un periodo de 3 días en vino sintético, manteniendo constante la relación de volumen de disolvente respecto al peso de hollejo. Para estudiar la influencia que pudieran tener los copigmentos provenientes de los chips en la extracción de antocianos de hollejo de uva tinta, una de las extracciones se llevó a cabo en presencia de chips de roble americano, en una concentración de 4 g L^{-1} , manteniendo la otra extracción como testigo del proceso.

Los sobrenadantes obtenidos de las extracciones realizadas a los hollejos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para determinar la cantidad de antocianos extraída, siguiendo una modificación del método descrito por Matilde García-Marino, José Miguel Hernández-Hierro, Julián C. Rivas-Gonzalo, y M.Teresa Escribano-Bailón (2010). Se identificaron hasta 15 antocianos diferentes por medio de las características espectrales y cromatográficas de estos picos y la suma de todos ellos se expresó como antocianos totales. Los resultados obtenidos en este ensayo corroboran la bondad del modelo utilizado para la predicción del contenido extraíble de antocianos totales en las muestras seleccionadas ya que solo dos muestras tienen un contenido total de antocianos extraíbles ligeramente superior a 1.8 mg g^{-1} de hollejos.

Para estudiar el efecto de la presencia de copigmentos provenientes de chips de roble americano en la extracción de antocianos en hollejo de uva, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y se buscaron agrupaciones no condicionadas de las muestras en función de la presencia o ausencia de chips de madera de roble. Sin embargo, no pudo encontrarse ninguna agrupación o tendencia en cuanto al factor analizado.

Para confirmar este resultado se realizó un ANOVA. Se utilizaron como variables dependientes, los contenidos extraíbles de antocianos obtenidos mediante HPLC y como factor la presencia o ausencia de copigmentos en el medio de extracción. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para ninguna de las variables dependientes estudiadas, lo que permite afirmar que la presencia de estos copigmentos no altera el proceso de extracción de antocianos en hollejo de uva. Por lo que estos copigmentos pueden ser añadidos en la vinificación con el objetivo de mejorar la calidad cromática de los vinos producidos, aumentando y estabilizando su color, sin temor a perjudicar de alguna forma la cantidad de antocianos extraída de los hollejos macerados.

4. Conclusiones

- El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano puede considerarse una técnica válida para la predicción del contenido extraíble de antocianos en hollejo de uva tinta, permitiendo, posteriormente, la identificación de muestras de uva con bajo contenido extraíble de antocianos susceptibles de una actuación para la mejora del color de los vinos producidos a partir de ellas.
- La adición de chips de madera de roble, fuente natural de copigmentos, podría aumentar y estabilizar el color del vino elaborado a partir de uvas con bajo contenido antociánico extraíble mediante reacciones de copigmentación, sin perjudicar el equilibrio de extracción de antocianos ni provocar fenómenos de adsorción en superficie que reduzcan la cantidad de antocianos disponibles.

Influence of oak wood chips–grape mix maceration on the extraction of anthocyanins from low-extractable anthocyanin content red grapes

Berta Baca-Bocanegra¹ · Julio Nogales-Bueno¹ · Francisco José Heredia¹ · José Miguel Hernández-Hierro¹

Received: 1 September 2017 / Revised: 4 October 2017 / Accepted: 13 October 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Wine color depends not only on the amount of anthocyanin present in the grapes, but also on the amount of them that may be extracted from grapes and their interactions with other phenolic compounds. Color stabilization is also specially important in poor color wines. The main goal of this study was to evaluate the effect of the addition of oak wood chips on the extractability of anthocyanins from homogeneous grapes which were previously classified by hyperspectral image analysis. Ten *Vitis vinifera* L. cv. Syrah grape skins from grapes previously classified as low-extractable anthocyanin content by hyperspectral image analysis were underwent to simulated maceration in wine-like solution, with or without French oak (*Quercus petraea* L.) wood light-toasted chips. For each sample, anthocyanin composition of the extracts was measured at the third day of maceration by HPLC chromatographic analysis and after that the obtained data were submitted to chemometric analysis. The presence of oak wood chips in the extraction media did not cause significant changes on the anthocyanin extractability for all samples in the aforesaid homogeneous created group. The use of this technique might allow wine producers obtaining red wines that may present high color quality and stability due to the copigmentation and color preservation procedure. Hyperspectral image analysis was a crucial non-destructive tool in this study that allows to sort the berries and then use the same samples for other destructive analyses such as the evaluation of influence of oak chips–grape mix maceration on the anthocyanin extraction from grape skins.

Keywords Anthocyanins · Chemical composition · Chemometrics · HPLC · Grapes

Introduction

Color is one of the main characteristic defining the quality of wines and usually the first attribute perceived by consumers. Deep color and hue are usually demanded by them. Thus, wine color is a very important parameter for winemakers who want to get high quality wines. Phenolic compounds participate in astringency, bitterness and color. Among them anthocyanins extracted from grape skin are the principal compounds involved in the color of red wines and their interactions with other phenolic compounds (called copigments), normally colorless, allow improving the color stabilization of aged wines by copigmentation reactions [1, 2]. Factors such as cultivar, growing region, climate, and growth conditions may influence the levels of anthocyanins [3–7].

The expression of the color in red wines depends not only on the amount of anthocyanin present in the grapes, but also on the amount of them that may be extracted from grapes. Several factors have been shown to affect the extraction of phenolic compounds into the must [8]. Due to their vacuolar location, the diffusion of anthocyanins into the must requires the break of their skin cell wall. Riper grapes have higher cell wall degradation; hence, they have higher extraction degree [8, 9]. This parameter is also linked to grape maceration conditions [10]. Soluble solids content of grape must and different stages of ripening also affect the amount of extractable phenols from grape skins [11–14].

The stressful climate conditions typical of the warm regions make difficult to obtain high quality red wines, with high intensity and stable color especially when they are subjected to aging process. This event normally

✉ José Miguel Hernández-Hierro
jmhhierro@us.es

¹ Food Colour and Quality Laboratory, Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

occurred since the phenolic and technological maturity of the grapes do not happen at the same time [5], and so, at the moment of harvesting the grapes have high sugar content but phenolic unripe [15]. Wines made from these grapes, low in pigments and cofactors, are not able to form much copigmentation [1] and as a result, the color stabilization does not correctly develop.

Taking into account these considerations, other alternatives winemaking techniques have been used aimed at implementing the production of high quality red wines in the last years. The procedures intended to enhance the extraction of grape components responsible for the color of wine or added other which allow improving the color stabilization such as copigments.

It is well known that the presence of copigments in red wines improve and stabilize its color by copigmentation reaction [7, 16, 17]. Wood is a natural source of phenols [18] that could be implied into copigmentation reactions. So adding oak wood chips as a source of copigments such as flavanols or ellagitannin could be a good alternative to resolve the problem of wine color stabilization. Anthocyanins have demonstrated to react with flavanols, involving acetaldehyde or not, to generate either acetaldehyde-derived or direct flavanol–anthocyanin condensation product [19–21]. The formation of most of anthocyanin-derived pigments is directly related to the presence in the wine of compounds such as proanthocyanidins or acetaldehyde. Oak ellagitannins have demonstrated to indirectly influence the formation of some of these derivative pigments. Their structures allow them to participate in oxidation reactions acting as consumers of oxygen and then protecting other compounds such as anthocyanins against oxidation, favoring the formation of acetaldehyde from ethanol in the medium [22] and favoring several polymerization reactions [22, 23]. In this way, the ellagitannins have the ability to modify the color of the red wine both indirectly as just indicated as directly, through the products derived from the direct reaction between anthocyanins and ellagitannins. So, anthocyanins can react with C-glucosidic ellagitannins to generate anthocyanin–ellagitannin hybrid pigments such as A-type and B-type vitisins [24, 25]. These pigments are more stable against hydration than their anthocyanin precursor [25]. The traditional source of ellagitannins is the oak barrels where the wine is kept during the aging process [26, 27]. Nevertheless, they can also be released from the chips or staves.

The main goal of this study is to evaluate the effect of the addition of oak wood chips as copigment sources on the anthocyanin extraction from grape skins. Those grapes were previously classified by hyperspectral image analysis according to the amount of anthocyanins transferred to the extraction media.

Materials and methods

Samples

Grapes of two red *V. vinifera* L. varieties (cv. Syrah and Tempranillo) were collected from two vineyards located in the Condado de Huelva Designation of Origin D.O. (Andalusia, Spain), which is under warm climatic conditions influence [7]. Grapes were collected when the vineyards were harvested (August 27 and 12, 2013, respectively). One hundred single berries were collected for each variety. To achieve representative grape samples, these were collected from both sides (sunlight and shade) of vines located in different rows within the vineyard. Edge rows and the first two vines in a row were avoided. Samples were collected from the top, middle, and bottom of the different clusters. After that, samples were refrigerated and they were immediately carried to the laboratory, tempered and subjected to the hyperspectral analysis.

Sample selection by hyperspectral analysis

Hyperspectral imaging was used to classify the grapes according to the amount of anthocyanins transferred to the extraction media [28]. Hyperspectral imaging device (Infaimon S.L., Barcelona, Spain) comprised a Xenics® XEVA-USB InGaAs camera (320 × 256 pixels; Xenics Infrared Solutions, Inc., Leuven, Belgium), a spectrograph (Specim ImSpector N17E Enhanced; Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland) covering the spectral range between 900 and 1700 nm (spectral resolution of 3.25 nm). The individual hyperspectral image of each grape was recorded. After calibration and segmentation processes, the average spectral profile for each grape was saved. Noisy wavebands at both extremes of the spectral range were removed. Thus, only spectral data in the resulting effective wavelength of 950–1650 nm regions were used in data analysis because of reduced efficiency outside this range in the used device. Grapes were classified as high- or low-extractable anthocyanin content according to the values predicted by the hyperspectral analysis.

Determination of extractable anthocyanin content

Grape skins were separated manually from the whole grapes and they were weighted, then grape skins were immediately frozen and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis were performed. Selected Syrah grape skins was split into two parts, then were underwent to simulated maceration in wine-like solution (12.5% ethanol, 4 g L^{-1} of tartaric acid adjusted at pH 3.6 with NaOH 0.5 M), with or without oak wood chips as a control. French oak (*Quercus petraea* L.) wood light-toasted chips of 1 cm^2 average size (Tonelería Martín y Vázquez,

Logroño, Spain) were added to the wine-like solution in a 4 g L^{-1} ratio. Grape skins were added to extraction media in a 1:20 ratio. For each sample, anthocyanin composition of the extracts was measured at the third day of maceration at ambient temperature and without agitation. To measure the extractable anthocyanin content, the supernatant was diluted 1:2 with 0.1 M HCl, filtered through $0.45 \mu\text{m}$ pore size filters and directly injected into the chromatographic system. Anthocyanin compounds were identified by HPLC analysis at 520 nm and comparing their retention times and spectral characteristics with data reported by relevant literature references [29, 30]. All analyses were performed in duplicate. Figure 1 shows the whole analytical workflow process.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Statistica version 8.0 software (Statistica, 2007). Principal component analysis was used as an unsupervised pattern recognition method to obtain a general overview about the samples taking into account individual, acylated, non-acylated and total anthocyanins as studied variables. Furthermore, univariate analysis of variance (ANOVA) was applied to discriminate among the means of chemical data (i.e., individual, acylated, non-acylated and total anthocyanins) taking into account pairs of control wines and wines with addition of oak wood chips. The statistically significant level was considered at $\alpha = 0.05$.

Results and discussion

Sample selection and anthocyanins analysis

Extractable anthocyanin content of Syrah grapes ranged from 0.02 to 3.67 mg g^{-1} of skin grapes expressed as

malvidin 3-*O*-glucoside equivalents with a standard deviation value of 0.63 mg g^{-1} of grape skin ($n = 98$). Tempranillo grapes ranged from 0.23 to 3.35 mg g^{-1} of grape skin expressed as malvidin 3-*O*-glucoside equivalents with a standard deviation value of 0.54 mg g^{-1} of grape skin ($n = 99$). The results reveal a wide heterogeneity of values. Levels of red grapes (*Vitis vinifera* L.) phenolic compounds depend on a number of factors including the variety of grape, high or low skin:volume ratio, growing region, climate, and growth conditions [31]. Furthermore, similar heterogeneity can be also found within the same physiological stage. Some studies describe a Gaussian bell-shaped distribution of soluble solids and extractable total phenolic content in a sampling point [14, 32]. Thus, there is substantial variation in levels of phenolic compounds generally.

Since extractable content of anthocyanin is lower in Syrah grapes than Tempranillo grapes the aforesaid cultivar was considered the most interesting variety for the assay. Statistical median value (1.8 mg g^{-1} of grape skin) was used as cut-off value. Ten Syrah grapes classified by the hyperspectral prediction model as low-extractable anthocyanin grapes were used in that assay (extractable anthocyanin content less than 1.8 mg g^{-1} of grape skin).

The separation carried out by HPLC allowed the quantification of 15 anthocyanins. Taking into account their basic structure, anthocyanins were also grouped as acetyls anthocyanins [delphinidin-3-*O*-(6'-acetyl)-glucoside, cyanidin-3-*O*-(6'-acetyl)-glucoside, petunidin-3-*O*-(6'-acetyl)glucoside, peonidin-3-*O*-(6'-acetyl)glucoside, malvidin-3-*O*-(6'-acetyl) glucoside], coumaroyls anthocyanins [cyanidin-3-*O*-(6'-*p*-coumaroyl)glucoside, petunidin-3-*O*-(6'-*p*-coumaroyl)glucoside (*trans*), malvidin-3-*O*-(6'-*p*-coumaroyl)glucoside (*cis*), peonidin-3-*O*-(6'-*p*-coumaroyl)glucoside (*trans*), malvidin-3-*O*-(6'-*p*-coumaroyl)glucoside (*trans*)], non-acylated anthocyanins (delphinidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-glucoside,

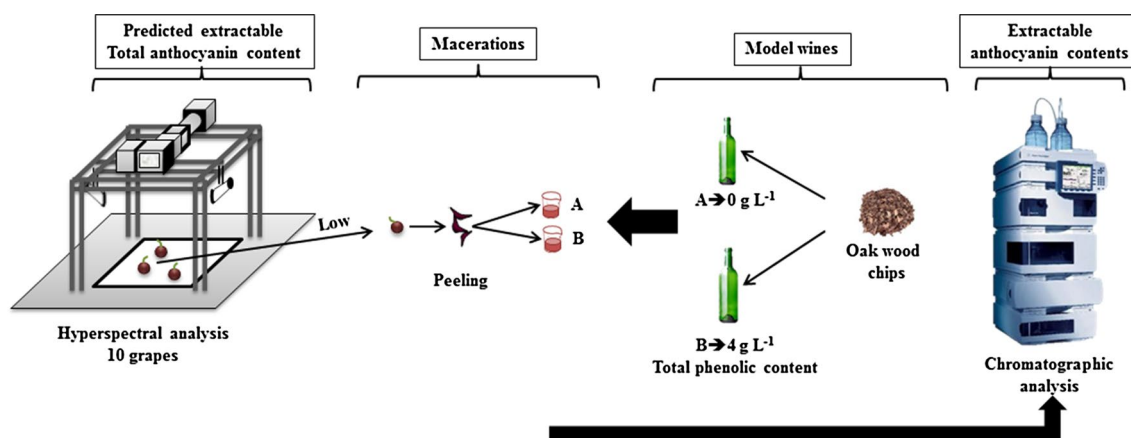


Fig. 1 Schematic representation of the entire process. Hyperspectral screening of the predicted extractable total anthocyanin content, model wines elaboration, macerations and chromatographic analyses of the extractable anthocyanin contents

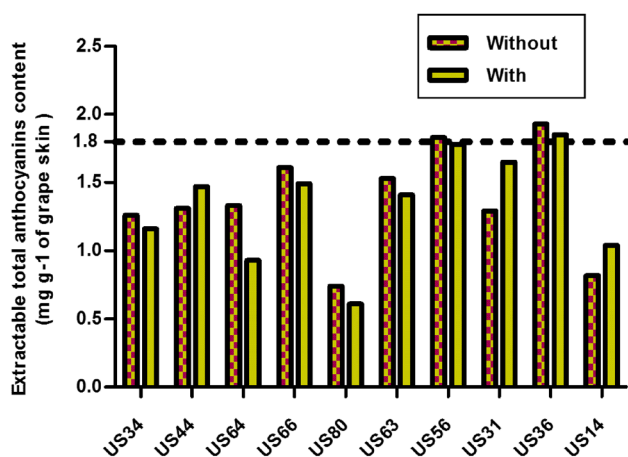


Fig. 2 Total extractable anthocyanins content (mg g^{-1} of grape skin) for each sample with or without oak wood chips. Horizontal line that intersects the axis y in the point 1.8 shows cut-off value to select the assay samples

petunidin 3-*O*-glucoside, peonidin 3-*O*-glucoside, malvidin 3-*O*-glucoside) and acylated anthocyanins as sum of acetyls and coumaroyls anthocyanins. The sum of all them was also expressed as total anthocyanins. The results were expressed as mg of malvidin-3-*O*-glucoside equivalents per gram of grape skin. Figure 2 shows total extractable anthocyanin content obtained for each sample with and without oak wood chips by HPLC analysis. The results obtained in this assay, taking into account only the samples without oak chips, are in accordance with values previously predicted by the hyperspectral method; only two samples have total extractable anthocyanin content slightly higher than 1.8 mg g^{-1} of grape skin. These results confirm that the aforementioned hyperspectral method presents a good potential for the classification of grapes according to extractable anthocyanin contents.

Changes in anthocyanin extraction

Principal component analysis was used as an unsupervised pattern recognition method in order to obtain a general trend of the samples. Figure 3 shows the projection of the samples on the plane defined by the first and second principal component. The first principal component (PC1) describes 54.72% of the variability in the data and the second (PC2) describes 26.10%. In the score plot, the samples are represented according to the presence or absence of oak wood chips. In this graph, it is not possible to observe a trend among extractable anthocyanin contents from samples extracted in model wine solution with or without oak wood chips.

Moreover, a univariate analysis of variance was carried out using extractable anthocyanin contents as dependent variables and presence or absence of oak wood chips in the model wine solutions as independent variable. Results are

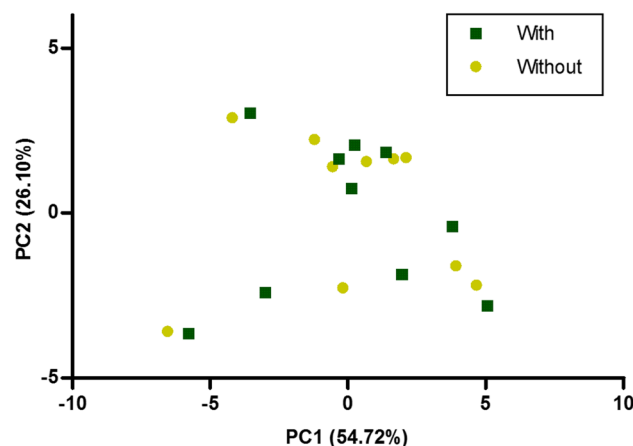


Fig. 3 Score plot of samples in the space defined by PC1 and PC2 codified as with or without addition of oak wood chips

shown in Table 1. No significant differences were found among wines and for each variable after a maceration process with oak wood chips ($p > 0.05$). This univariate analysis confirms the previous general overview obtained in the PCA analysis and highlights that none of the studied variables has been perturbed by the presence of oak wood chips.

The addition of oak wood chips to extraction media neither resulted in a significant increase nor a decrease of the extractable anthocyanin content. Therefore, it could be reasonable to assume that did not take place adsorption of the anthocyanins on the chips surface. Thus, the anthocyanins present in the media are available to participate in the suitable chemical reactions that lead to new derivatives resulting in changes of wine color. Apart from that, oak derived compounds transferred to the media such as flavanols or ellagitannins can react with anthocyanins to generate anthocyanin–ellagitannin hybrid pigments more stable than their precursor [24]. Indirectly, ellagitannins also affect the wine color since they protect anthocyanins from oxidation [22] and favoring several polymerization reactions [22, 23].

Conclusions

The hyperspectral method previously described was used here for the selection of samples and presents a good potential for the classification of grapes according to extractable total anthocyanin contents.

Moreover, it can be assumed from the results that the presence of oak wood chips in the extraction media did not cause significant changes in the anthocyanin extractability for all samples. This practice does not promote the extraction of anthocyanins from skin but extraction of specific colorless oak chips compounds which could stabilize wine color

Table 1 Extractable anthocyanin contents (mg g⁻¹ of skin grape \pm SD. $n = 10$) expressed as malvidin-3-*O*-glucoside equivalents of Syrah wine with or without oak wood chips

Peak	Without	With
Delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside	6.9E-02 \pm 3.8E-02 ^a	7.2E-02 \pm 3.3E-02 ^a
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	1.3E-02 \pm 1.4E-02 ^a	1.1E-02 \pm 1.0E-02 ^a
Petunidin 3- <i>O</i> -glucoside	8.6E-02 \pm 3.6E-02 ^a	8.7E-02 \pm 3.5E-02 ^a
Peonidin 3- <i>O</i> -glucoside	8.6E-02 \pm 4.7E-02 ^a	7.5E-02 \pm 4.2E-02 ^a
Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside	5.7E-01 \pm 1.5E-01 ^a	5.6E-01 \pm 1.6E-01 ^a
Delphinidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)-glucoside	1.6E-02 \pm 9.4E-03 ^a	1.8E-02 \pm 9.4E-03 ^a
Cyanidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)-glucoside	6.3E-03 \pm 5.3E-03 ^a	5.9E-03 \pm 4.7E-03 ^a
Petunidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)glucoside	2.7E-02 \pm 1.1E-02 ^a	2.8E-02 \pm 1.1E-02 ^a
Peonidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)glucoside	2.8E-02 \pm 1.2E-02 ^a	2.5E-02 \pm 1.1E-02 ^a
Malvidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)glucoside	3.2E-01 \pm 1.0E-01 ^a	3.2E-01 \pm 1.0E-01 ^a
Cyanidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside	2.7E-02 \pm 5.0E-03 ^a	2.5E-02 \pm 7.9E-03 ^a
Petunidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>trans</i>)	8.1E-03 \pm 8.7E-03 ^a	9.3E-03 \pm 8.4E-03 ^a
Malvidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>cis</i>)	4.9E-03 \pm 2.4E-03 ^a	5.9E-03 \pm 3.3E-03 ^a
Peonidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>trans</i>)	1.0E-02 \pm 5.9E-03 ^a	1.2E-02 \pm 6.1E-03 ^a
Malvidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>trans</i>)	6.9E-02 \pm 4.6E-02 ^a	7.9E-02 \pm 5.1E-02 ^a
Total non-acylated	8.2E-01 \pm 2.6E-01 ^a	8.1E-01 \pm 2.5E-01 ^a
Total acetyls	4.0E-01 \pm 1.3E-01 ^a	4.0E-01 \pm 1.3E-01 ^a
Total coumaroyls	1.2E-01 \pm 6.2E-02 ^a	1.3E-01 \pm 6.8E-02 ^a
Total acylated	5.2E-01 \pm 1.3E-01 ^a	5.3E-01 \pm 1.4E-01 ^a
Total	1.3 \pm 3.9E-01 ^a	1.3E \pm 3.9E-01 ^a

The same letter within each row and for each type of anthocyanin indicate the absence of significant differences ($p > 0.05$)

protecting anthocyanins against oxidation or interacting with them to generate more stable derivatives.

Taking into account, the addition of oak wood chips may be a good technique to obtain red wines that may present better color quality and stability due to the copigmentation procedure. However, further studies would be necessary to assess the effect that other sources of copigments or other amount of them have in the anthocyanin extraction.

Acknowledgements The Spanish Ministerio de Economía y Competitividad is thanked for project AGL-2014-58486-C2. Universidad de Sevilla is thanked for B. Baca-Bocanegra predoctoral grant (VPPI-II.2) and J. Nogales-Bueno postdoctoral grant (VPPI-II.4). The authors thank the technical staff of Biology Service [Servicios Generales de Investigación (SGI), Universidad de Sevilla].

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Compliance with ethics requirements This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Boulton R (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wines. A critical review. *Am J Enol Vitic* 52:67–87
- Gordillo B, Cejudo-Bastante MJ, Rodriguez-Pulido FJ, Gonzalez-Miret ML, Heredia FJ (2013) Application of the differential colorimetry and polyphenolic profile to the evaluation of the chromatic quality of Tempranillo red wines elaborated in warm climate. Influence of the presence of oak wood chips during fermentation. *Food Chem* 141:2184–2190
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am J Enol Vitic* 57:257–268
- Ferrer-Gallego R, Hernandez-Hierro JM, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailon MT (2012) Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. *Anal Chim Acta* 732:73–77
- Mira de Orduña R (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res Int* 43:1844–1855
- Ryan JM, Revilla E (2003) Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J Agric Food Chem* 51:3372–3378
- Gordillo B, Rodriguez-Pulido FJ, Mateus N, Escudero-Gilete ML, Gonzalez-Miret ML, Heredia FJ, de Freitas V (2012) Application of LC-MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region. *Anal Chim Acta* 732:162–171
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A, Glories Y, Maujean A, Branco JM (2006) Handbook of enology, the microbiology of wine and vinifications, vol 1. Wiley, Chichester
- Hernandez-Hierro JM, Quijada-Morin N, Martinez-Lapuente L, Guadalupe Z, Ayestaran B, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailon MT (2014) Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chem* 146:41–47

10. González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (2004) Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal Chim Acta* 513:283–289
11. Canals R, Llaudy MC, Valls J, Canals JM, Zamora F (2005) Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Anal Chim Acta* 53:4019–4025
12. Fournand D, Vicens A, Sidhoum L, Souquet JM, Moutounet M, Cheynier V (2006) Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *J Agric Food Chem* 54:7331–7338
13. Hernandez-Hierro JM, Quijada-Morin N, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailon MT (2012) Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Anal Chim Acta* 732:26–32
14. Zouid I, Siret R, Jourjon F, Mehinagic E, Rolle L (2013) Impact of grapes heterogeneity according to sugar level on both physical and mechanical berries properties and their anthocyanins extractability at harvest. *J Texture Stud* 44:95–103
15. Mori K, Sugaya S, Gemma H (2005) Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci Hortic Amst* 105:319–330
16. González-Manzano S, Dueñas M, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT, Santos-Buelga C (2009) Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem* 114:649–656
17. Gordillo B, Rodríguez-Pulido FJ, Gonzalez-Miret ML, Quijada-Morin N, Rivas-Gonzalo JC, Garcia-Estevéz I, Heredia FJ, Escribano-Bailon MT (2015) Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin–flavonol–flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions. *J Agric Food Chem* 63:7645–7653
18. De Rosso M, Cancian D, Panighel A, Dalla Vedova A, Flamini R (2008) Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatile compounds and polyphenols. *Wood Sci Technol* 43:375–385
19. Escribano-Bailón T, Dangles O, Brouillard R (1996) Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry* 41:1583–1592
20. Francia-Aricha EM, Guerra MT, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (1997) New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J Agric Food Chem* 45:2262–2266
21. Rivas-Gonzalo JC, Bravo-Haro S, Santos-Buelga C (1995) Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J Agric Food Chem* 43:1444–1449
22. Vivas N, Glories Y, Lagune L, Saucier C, Augustin M (1994) Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde. *J Int Sci Vigne Vin* 28:319–336
23. Timberlake CF, Bridle P (1976) Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am J Enol Vitic* 27:97–105
24. Quideau S, Jourdes M, Lefeuvre D, Montaudon D, Saucier C, Glories Y, Pardon P, Pourquier P (2005) The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chemistry* 11:6503–6513
25. Chassaing S, Lefeuvre D, Jacquet R, Jourdes M, Ducasse L, Galland S, Grelard A, Saucier C, Teissedre P-L, Dangles O, Quideau S (2010) Physicochemical studies of new anthocyan-ellagitannin hybrid pigments: about the origin of the influence of oak C-glycosidic ellagitannins on wine color. *Eur J Org Chem* 1:55–63
26. García-Estévez I, Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, Alcalde-Eon C (2012) Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. *J Agric Food Chem* 60:1373–1379
27. Cadahia E, Varea S, Muñoz L, Fernandez de Simon B, García-Vallejo MC (2001) Evolution of ellagitannins in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *J Agric Food Chem* 49:3677–3684
28. Nogales-Bueno J, Baca-Bocanegra B, Rodríguez-Pulido FJ, Heredia FJ, Hernández-Hierro JM (2015) Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins. *Food Chem* 172:559–564
29. Garcia-Marino M, Hernandez-Hierro JM, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailon MT (2010) Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Anal Chim Acta* 660:134–142
30. Hernández-Hierro JM, Nogales-Bueno J, Rodríguez-Pulido FJ, Heredia FJ (2013) Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening. *J Agric Food Chem* 61:9804–9809
31. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H (2006) Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing, Oxford
32. Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, De Freitas V, Zamora F (2011) Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem* 124:767–774

CAPÍTULO 2: ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO Y LA EXTRACTABILIDAD DE FENOLES TOTALES Y FLAVANOLES EN SEMILLAS DE UVA MEDIANTE ANALISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL EN EL INFRARROJO CERCANO

En: Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Heredia Mira, Francisco José; Hernández Hierro, José Miguel: *Estimation of total phenols, flavanols and extractability of phenolic compounds in grape seeds using vibrational spectroscopy and chemometric tools*. Sensors 2018. Vol. 18. Pág. 2426-2438, <https://doi.org/10.3390/s18082426>

1. Antecedentes

En la uva, los compuestos fenólicos se encuentran repartidos por todo el fruto, tanto en semillas como hollejos y pulpa. Aunque las semillas representan solo 0-6% del peso de la baya, son una fuente importante de compuestos fenólicos para los vinos. Dependiendo de la variedad, las semillas de uva contienen hasta la mitad de los compuestos fenólicos de la baya, y representan entre 4 y 6% del peso de la semilla (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Los compuestos fenólicos más importantes en la semilla de uva son los flavanoles y pueden aparecer tanto en forma de monómeros como de oligómeros y polímeros compuestos de distintas subunidades monoméricas (Hidalgo Togores, 2010; Ristic, et al., 2005).

Durante el proceso de vinificación, concretamente en la maceración, los compuestos fenólicos presentes en la semilla pasan directamente al vino (Waterhouse, 2002) y condicionan de forma considerable las características sensoriales del mismo. Por lo general, están relacionados con el sabor (acidez, amargor y astringencia) y el color (a través del fenómeno de la copigmentación) de los vinos tintos (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean y Dubourdieu, 2006). Por lo tanto, conocer la cantidad de fenoles de las semillas de uva que se transfieren al vino, o contenido fenólico extraíble, despierta interés en la industria del vino, ya que la calidad del vino depende en gran medida de este aspecto. Factores como el grado de madurez del fruto y la degradación de la pared celular, condicionan la facilidad de extracción de los compuestos fenólicos desde las semillas de uva (Bautista-Ortín, et al., 2013; Cadot, et al., 2006; Rodríguez-Pulido, et al., 2014).

Tradicionalmente, la determinación de los compuestos fenólicos de la uva o de las diferentes partes de la misma se ha llevado a cabo mediante análisis espectrofotométricos o cromatográficos que requieren maceraciones previas de las muestras. Estos métodos además de ser lentos, conllevan la destrucción de la muestra, por lo que tiene gran interés reemplazarlos por métodos

más rápidos y no destructivos que permitieran hacer un número más elevado de determinaciones en menos tiempo y utilizar las mismas muestras para diferentes análisis.

En los últimos años, la espectroscopía de infrarrojo cercano se ha instaurado como alternativa a los métodos tradicionales proporcionando una respuesta rápida, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente. Concretamente, el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano ha sido aplicado en varias ocasiones para la determinación, a modo exploratorio, de diversos parámetros de interés en uva con buenos resultados. Puede ser considerada una técnica adecuada para la estimación del contenido y la extractabilidad de compuestos fenólicos en semillas de uva.

2. Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido el desarrollo de métodos rápidos y no destructivos para la estimación del contenido total, contenido extraíble y extractabilidad de fenoles totales y flavanoles totales en semillas de uva tinta mediante análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano.

3. Parte Experimental

Se utilizaron muestras de semilla de uva tinta pertenecientes a las variedades Tempranillo y Syrah, recolectadas en la región del Condado de Huelva (Andalucía, España) durante la vendimia de 2014. Se recolectó un total de doscientas uvas, cien por variedad. Con el fin de obtener conjuntos representativos de muestras, se recogieron uvas de la parte superior, media e inferior del racimo y de racimos situados en zona de sol y de sombra. Las muestras fueron refrigeradas e inmediatamente transportadas al laboratorio.

Tras la recepción de las muestras, las semillas de cada uva fueron separadas del resto de la baya. A continuación, siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Pulido, et al. (2014) se registraron las imágenes hiperespectrales de las semillas de uva pertenecientes a cada uva individual. Las imágenes de cada una de las muestras se calibraron respecto a un patrón de referencia y la corriente oscura del equipo, y se almacenó el espectro medio de cada muestra (950–1650 nm). Finalmente, las muestras de semillas se pesaron y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los correspondientes análisis químicos.

Se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de reducir la dimensión de la matriz espectral obtenida, sin pérdida de información espectral significativa, y seleccionar muestras representativas del conjunto de datos espectrales. La selección de muestras se llevó a cabo siguiendo una modificación del método de Nogales-Bueno, et al. (2015) como se describe en detalle en Nogales-Bueno, Baca-Bocanegra, Rooney, Hernandez-Hierro, Byrne, y

Heredia (2017). Teniendo en cuenta 8 componentes principales se consiguió explicar el 90 % de la variabilidad espectral de los datos originales. Se calcularon las distancias de Mahalanobis (H) para cada muestra y se agruparon todas las muestras que tuvieran una distancia de Mahalanobis a muestra vecina (NH) menor que 0.6, obteniéndose 66 grupos distintos. A continuación, se crearon conjuntos de calibración y validación asignando una muestra de cada grupo creado a cada conjunto. El conjunto de calibración consistió en 66 muestras en el cual estaba representada toda la variabilidad espectral del conjunto original, mientras que el conjunto de validación estaba compuesto por solo 26 muestras ya que 40 de los 66 grupos creados estaban formados por una única muestra. Finalmente, se pesaron las 92 muestras de semillas seleccionadas y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se llevaron a cabo los análisis químicos.

Se determinó el contenido fenólico total extraíble (EPC), el contenido flavanólico extraíble (EFC), el contenido fenólico total (TPC), el contenido flavanólico total (TFC), la extractabilidad de fenoles totales (ETP) y la extractabilidad de flavonoles (EF) para las 92 muestras seleccionadas, y estas nuevas variables se usaron como parámetros de referencia en los análisis quimiométricos posteriores. Los contenidos extraíbles se determinaron mediante el análisis de los sobrenadantes de las extracciones de semillas de uva en vino modelo (12.5% (v/v) de etanol, 4 g de ácido tartárico L^{-1} , ajustado a pH 3,6 con NaOH 0.5 M). A continuación, las semillas de uva se sometieron a una extracción exhaustiva en metanol:agua 75:25 (v/v) y se obtuvieron los contenidos totales de fenoles y flavonoles como la suma de ambas extracciones. Finalmente, la extractabilidad de fenoles totales y flavonoles de cada muestra se determinó como el cociente entre el contenido extraíble y el contenido total para cada parámetro.

Se aplicó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton, et al., 1965) para determinar el contenido fenólico total extraíble y el contenido fenólico total, mientras que para la determinación del contenido flavanólico extraíble y el contenido flavanólico total se siguió una modificación del método de Vivas, et al. (1994).

Una vez determinados los parámetros de referencia, se realizó la calibración mediante regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS) utilizando los espectros alojados en el set de calibración y los datos de referencia anteriormente mencionados. Se probaron distintos pretratamientos espectrales para optimizar el error estándar de calibración que se obtiene en el proceso de validación cruzada (SECV) y se seleccionó el modelo que menor error generaba. Tras esto, se realizó la validación externa del modelo usando las muestras seleccionadas para tal efecto. Como resultado del proceso de validación, se obtuvo el error estándar de predicción (SEP) en validación externa para cada modelo. Los algoritmos desarrollados permiten predecir de forma adecuada el contenido fenólico total y el contenido flavanólico total en semillas de uva con errores estándar de predicción de 11.23 y 4.85 mg g^{-1} de semilla de uva (32.15% y 23.31% respectivamente). Errores similares han sido descritos previamente para estos parámetros usando

espectroscopia en el infrarrojo cercano (Cozzolino, Kwiatkowski, Parker, Cynkar, Damberg, Gishen, et al., 2004; Ferrer-Gallego, et al., 2010; Jara-Palacios, et al., 2016; Rodríguez-Pulido, et al., 2014). Para el resto de los parámetros evaluados (EPC, EFC, ETP y EF) los modelos proporcionan errores estándar de predicción en validación externa elevados que comprometen su uso con fines predictivos. Debido a la gran importancia de estos parámetros, se llevaron a cabo otros enfoques para ETP y EF con el fin de vincular la extractabilidad fenólica en semillas de uva a sus características espectrales en la región del infrarrojo cercano. Para ello, las muestras de semilla de uva se clasificaron según su extractabilidad de compuestos fenólicos (extractabilidad de fenoles totales y extractabilidad de flavonoles) utilizando un análisis de conglomerados de K-medias. Teniendo en cuenta estas dos variables, las muestras de calibración y validación se clasificaron en muestras con alta y baja capacidad de extracción. Posteriormente, se realizó un análisis discriminante lineal (LDA) por pasos para discriminar las muestras entre los dos niveles de extractabilidad (alto o bajo). Se introdujeron como variables clasificatorias las puntuaciones de los 8 primeros componentes principales, obtenidas de datos hiperespectrales y utilizadas previamente para la selección de muestras. Este modelo permitió discriminar correctamente un 83.3% de las muestras en el proceso de validación interna y un 76.9% de éstas en la validación cruzada dejando una muestra fuera.

Por último, los métodos desarrollados, tanto cuantitativos como cualitativos, se aplicaron a todo el conjunto de muestras de semillas de uva recolectadas, con excepción de un *outlier* espectral ($H > 3$) encontrado en el análisis de componentes principales inicial. Al aplicar los modelos de calibración cuantitativa, se realizó la predicción de los contenidos totales fenólicos y flavanólicos. Los dos parámetros presentan una distribución gaussiana para las dos variedades de uva analizadas, Tempranillo y Syrah, lo que confirma la heterogeneidad fenólica descrita previamente en bibliografía para el contenido fenólico de uvas con el mismo estado de maduración (Nogales-Bueno, et al., 2015). Los parámetros predichos muestran valores más altos para la variedad Syrah. El análisis cualitativo permitió clasificar el conjunto total de semillas como muestras con alto o bajo nivel de extractabilidad de forma que el conjunto de bajo nivel de extractabilidad estaba constituido por un total 172 muestras, 30 de la variedad Syrah y 97 de variedad Tempranillo mientras que el conjunto de alto nivel de extractabilidad estaba formado por 72 muestras en la proporción 69:3 Syrah:Tempranillo. Estos resultados indican mayores extractabilidades fenólicas en las semillas de uva de variedad Syrah.

4. Conclusiones

- El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano puede considerarse una técnica adecuada para estimar el contenido fenólico total y contenido flavanólico total en semillas de uva tinta de una manera rápida y razonablemente económica. Sin embargo, proporciona errores mayores a los esperados en la estimación del contenido extraíble y la extractabilidad de fenoles totales y flavanoles en las muestras objeto de análisis.
- El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano tiene un poder discriminatorio satisfactorio para la clasificación de muestras de semilla de uva tinta según su nivel de extractabilidad fenólica.
- La aplicación de los modelos cuantitativos desarrollados para la estimación del contenido fenólico total y contenido flavanólico total en semillas de uva proporciona una distribución gaussiana de estos parámetros que confirma la heterogeneidad fenólica descrita en bibliografía. Para ambos parámetros se observan valores más altos en las muestras de variedad Syrah que en las de Tempranillo, resultado que se corresponde con mayores extractabilidades fenólicas en las semillas de variedad Syrah según los resultados obtenidos al aplicar el modelo cualitativo desarrollado.

Article

Estimation of Total Phenols, Flavanols and Extractability of Phenolic Compounds in Grape Seeds Using Vibrational Spectroscopy and Chemometric Tools

Berta Baca-Bocanegra, Julio Nogales-Bueno * , Francisco José Heredia and José Miguel Hernández-Hierro 

Food Colour and Quality Laboratory, Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain; bbaca1@us.es (B.B.-B.); heredia@us.es (F.J.H.); jmhhierro@usal.es (J.M.H.-H.)

* Correspondence: julionogales@us.es; Tel.: +34-954-557-017

Received: 18 June 2018; Accepted: 24 July 2018; Published: 26 July 2018



Abstract: Near infrared hyperspectral data were collected for 200 Syrah and Tempranillo grape seed samples. Next, a sample selection was carried out and the phenolic content of these samples was determined. Then, quantitative (modified partial least square regressions) and qualitative (K-means and lineal discriminant analyses) chemometric tools were applied to obtain the best models for predicting the reference parameters. Quantitative models developed for the prediction of total phenolic and flavanolic contents have been successfully developed with standard errors of prediction (SEP) in external validation similar to those previously reported. For these parameters, SEPs were respectively, 11.23 mg g⁻¹ of grape seed, expressed as gallic acid equivalents and 4.85 mg g⁻¹ of grape seed, expressed as catechin equivalents. The application of these models to the whole sample set (selected and non-selected samples) has allowed knowing the distributions of total phenolic and flavanolic contents in this set. Moreover, a discriminant function has been calculated and applied to know the phenolic extractability level of the samples. On average, this discrimination function has allowed a 76.92% of samples correctly classified according their extractability level. In this way, the bases for the control of grape seeds phenolic state from their near infrared spectra have been established.

Keywords: phenolic compounds; extractability; total phenols; flavanols; grape seeds; near infrared; vibrational spectroscopy; chemometrics

1. Introduction

There is a high variability of phenolic compounds in grapes (*Vitis vinifera* L.). These compounds can be found in the whole berry (skin, pulp and seeds) and in the fermentation stage, they become part of the wine [1]. Depending on varieties, grape seeds contains up to half of the berry phenolic compounds, and they represent between 4% and 6% of the seed weight [2]. In grape seed, the most important phenolic compounds are flavanols (or flavan-3-ols). They can be found as monomers ((+)-catechin, (–)-epichatechin or epichatechin 3-galate) oligomers or polymers [3]. Moreover, phenolic acids (benzoic or hidroxycinnamic acids) are also found in grape seeds [4]. These phenolic compounds play an important role in the sensory characteristics of wine. They are typically linked to the flavor (acidity, bitterness and astringency) and color (via copigmentation phenomena) of red wines [5].

Therefore, knowing the amount of phenols that are transferred to wine from grape seeds (i.e., extractable total phenolic content or extractable phenolic content) is an essential issue in the wine

industry, since the quality of wine depends largely on this aspect. Extractable phenolic content largely depends on the total amount of phenolic compounds that grape seeds have (i.e., total phenolic content). In consequence, it is necessary to define the extractability as the ratio between the extractable phenolic content and the total phenolic content. Phenolic extractability allows comparing samples with different total phenolic content and sorting samples according to their phenolic extractability.

There are a number of methods that allow obtaining the extractable or total content of the more important phenolic families. For example, in grape seed samples, the Folin-Ciocalteu [6] and 4-dimethyl-aminocinnamaldehyde (DMACA) [7] methods can be applied in order to obtain the extractable or total content of total phenols and flavanols, respectively (being total phenols the totality of phenolic compounds present in grape seeds, i.e., phenolic acids, flavanols, flavonols, etc.). These kind of traditional methods for the control of parameters of interest in grapes are being replaced by non-destructive and green chemistry methods. Among them, a high number of near infrared hyperspectral methods have been developed in the last decade in order to screen several parameters of interest in grapes [8]. In some studies, hyperspectral imaging is applied to predict total or extractable phenolic content in grapes or grape seeds [9,10], to control phenolic or technological maturity [11] or to control the composition of oenological by-products [12].

In this study, hyperspectral imaging has been applied to control the extractable phenolic content, the total phenolic content and the extractability of phenolic compounds. In particular, flavanols and total phenols have been studied. Near infrared spectra have been acquired for two hundred samples of Syrah and Tempranillo grape seeds and a sample selection procedure has been carried out. Next, reference parameters, extractable and total contents and phenolic extractability of total phenols and flavanols, have been chemically evaluated for selected samples. Then a number of chemometric approaches have been interrogated (PCA, MPLS, K-means cluster analysis and LDA) in order to obtain the best methods for predicting the reference parameters. Finally, the developed methods have been applied to all samples with the exception of spectral outliers and the obtained distributions of the reference parameters have been evaluated in the samples.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Grape seeds from two hundred Syrah and Tempranillo grapes (*Vitis vinifera* L.) were used in this study. The procedures carried out for grape collection and grape seed extraction from the whole grapes are described in detail elsewhere in [13]. Briefly, two hundred Syrah and Tempranillo red grape samples were collected from two vineyards located in the Condado de Huelva Designation of Origin D.O. (Andalusia, Spain) on two different dates (7 and 11 August 2014). In order to achieve representative samples sets, single grapes were collected from the top, middle and bottom of the cluster and from the sunlight and shade side. The samples were refrigerated and immediately transported to the laboratory.

2.2. Acquisition of Hyperspectral Data

Hyperspectral images of grape seeds belonging to an individual grape were jointly acquired. Hyperspectral data collection is described in Rodríguez-Pulido, et al. [10]. Briefly, hyperspectral imaging device (Infaimon S.L., Barcelona, Spain) comprised a Xenics® XEVA-USB InGaAs camera (320 × 256 pixels; Xenics Infrared Solutions, Inc., Leuven, Belgium), a spectrograph (Specim ImSpector N17E Enhanced; Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland) covering the spectral range between 900 and 1700 nm (spectral resolution of 3.25 nm). Samples were placed 40 cm below the camera's scanning window and two 70 W tungsten iodine halogen lamps (Prilux, Barcelona, Spain) were used as lighting sources at 45° from the vertical.

Raw hyperspectral images were corrected from the dark current effect, then, the regions of interest (i.e., pixels belonging to grape seeds) were selected. The selection of the regions of interest was carried

out by means of a forward stepwise discriminant analysis. For that, a number of spectra belonging to seeds and background (a homogeneous surface composed of polyethylene) were manually collected and they were used for the creation of the algorithm of segmentation. The algorithm saved all the masks of segmentation and they were visually supervised for ensuring the suitability of the proposed method. Then, the average reflectance spectra were obtained for each grape seed sample. Next, spectra were transformed to relative absorbances and the spectral region comprised between 950 and 1650 nm was saved and a spectral matrix (200 samples \times 215 wavelengths) was formed. Figure 1 describes the whole procedure carried out for each sample from the spectra acquisition until the obtaining the average spectrum.

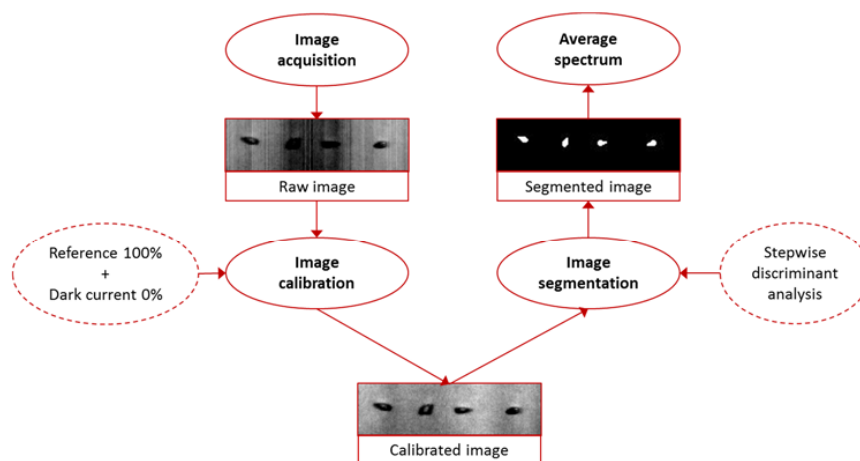


Figure 1. Description of the procedure carried out for each sample from the raw hyperspectral image acquisition until obtaining the average spectrum.

2.3. Sample Selection

A sample selection procedure was carried out to reduce the dimension of the spectral matrix without losing of significant spectral information and to decrease the number of seed samples to be chemically analyzed. Sample selection was carried out following a modification of the method of Nogales-Bueno, et al. [14] as it is described in detail in [13]. In brief, a principal component analysis (PCA) was applied to the near infrared spectral matrix and, as result, 66 groups of samples spectrally different were identified. Next, calibration and validation sets were created by allocating one sample from every group respectively. Therefore, the calibration set consisted of 66 samples, while the validation set was composed of only 26 samples because there were two or more samples in only 26 groups. Finally, the weight of these 92 seed samples was measured and they were conserved at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until chemical analyses were carried out.

2.4. Phenolic Characterization of Grape Seeds: Extractable Content, Total Content and Extractability of Total Phenols and Flavanols

Extractable total phenolic content (EPC), extractable flavanolic content (EFC), total phenolic content (TPC), total flavanolic content (TFC), extractability of total phenols (ETP) and extractability of flavanols (EF) were measured for samples selected in Section 2.3 and these variables were used as reference parameters in the subsequent chemometric approaches.

Extractable contents were determined by the analysis of the supernatants of grape seeds extractions in model wine (12.5% (*v/v*) ethanol, 4 g L^{-1} tartaric acid, adjusted at pH 3.6 with NaOH 0.5 M). A ratio of 25 mL of model wine per each gram of seed was kept constant for all samples. These macerations were carried out at room temperature in a dry place during 72 h without any external agitation. Supernatants were used for the determination of the extractable contents. Next, they were freeze-dried, grounded and macerated in methanol:water 75:25 (*v/v*), sonicated during

15 min (JP Selecta, Barcelona, Spain) and centrifuged ($830 \times g$, 15 min). This solution was added in a constant ratio of 10 mL g^{-1} for all samples. These extractions were repeated twice in order to achieve an exhaustive extraction of phenolic compounds. The methanolic extracts were combined and finally made up to a final volume of 50 mL with methanol. These supernatants were analyzed and the results combined with those obtained from the model macerations and total contents of total phenols and flavanols were obtained.

EPC and TPC were determined using the Folin-Ciocalteu method [6]. Two hundred microliters of exhaustive or model wine supernatants were mixed with 1.5 mL of sodium carbonate (20% *w/v*), 500 μL of Folin reagent and made up to 10 mL with ultrapure water.

In order to measure EFC and TFC, a modification of Vivas et al. [7] method was carried out. Ten or twenty microliters of exhaustive or model wine supernatants were mixed with 190 μL or 180 μL of methanol respectively and 1 mL of DMACA (4-dimethylaminocinnamaldehyde) reagent.

Both Folin-Ciocalteu and DMACA analyses were performed on an Agilent 8453 UV-Visible spectrophotometer (Palo Alto, CA, USA), equipped with diode array detection (DAD), measuring absorbance at 765 and 640 nm respectively. The extract volumes were appropriately modified for samples which needed it. For quantification, Folin-Ciocalteu results were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of grape seed, whereas DMACA results were expressed as mg of catechin equivalents per gram of grape seed.

Finally, ETP and EF of each sample were evaluated as follows:

$$ETP = \frac{EPC}{TPC} \times 100; EF = \frac{EFC}{TFC} \times 100 \quad (1)$$

2.5. Data Analysis

2.5.1. Quantitative Calibrations

Raw spectral data of samples allocated in the calibration set were used to develop a quantitative calibration for each reference parameter. The corresponding reference parameters were allocated to each sample and different spectral pretreatments were tested. A number of spectral pretreatments, such as standard normal variate (SNV), multiplicative scatter correction (MSC) or detrending, were applied to spectral samples allocated in the calibration set in order to remove the scattering effects [15,16]. Moreover, the effect of differentiation and variations in spectral ranges were tested in the development of the NIRS calibrations. Afterwards, a modified partial least squares (MPLS) regression was performed for each reference parameter. In MPLS regression, calibration samples are split in different subsets. In this way, a cross-validation is performed, the possibility of overfitting is reduced, the number of PLS factors are set and chemical outliers are removed [17]. Detection of chemical outliers was performed following a $T \geq 2.5$ criterion and these samples were not taken into account in the MPLS regression due to their high residual predicted value. Finally, the standard error of cross-validation was obtained by the combination of the validation errors in a single figure.

A number of statistics were used to evaluate the performance of the obtained calibration models. The applicability range of the models is defined by the maximum and minimum estimations and, jointly with the standard deviation (SD), allows knowing what data can be used for an external validation. The standard error of calibration (SEC) and standard error of cross-validation (SECV) are estimates of the prediction capability of the equation. It is considered that SECV statistic is similar to the average standard error of prediction (SEP) from 10 randomly chosen prediction sets. The multiple correlation coefficient (RSQ) measures how well the calibration fits the data. Finally, standard error of prediction (SEP) compares the real with the predicted values obtained for the reference parameter. It is obtained SEP in internal validation if this comparison is made for samples that do belong to the calibration set, else it is obtained SEP in external validation. In this study, external validations were carried out.

Quantitative models, sample selection, PCA and data pretreatments were carried out in Win ISI[®] (v1.50) software (Infrasoft International, LLC, Port Matilda, PA, USA).

2.5.2. K-Means Cluster Analysis

K-means cluster analysis was performed using Statistica v.8.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Samples were classified according to their extractability of phenolic compounds (i.e., ETP and EF). Initial between-cluster distances were maximized by choosing the appropriate initial cluster centers. Then, two groups of samples were established according to their phenolic extractability levels: Low and high extractability groups.

2.5.3. Supervised Pattern Recognition Analysis

Linear discriminant analysis (LDA) was applied in the present study as supervised pattern recognition method. This method was carried out using the prior probabilities of classification and the size of each group was taken into account. Samples correctly classified were considered in order to estimate the prediction ability of the method. For that, leave-one-out cross-validation and external validation were applied. The variables used were the scores of the 8 first PCs performed on the near infrared hyperspectral data. All variables were used in the analysis. SPSS 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used for the LDA implementation.

3. Results and Discussion

3.1. Near Infrared Hyperspectral Data

In Figure 2, near infrared spectra are described. Figure 2a shows the average raw spectra and the standard deviations (amplified 10 times) for Syrah and Tempranillo samples. Average raw spectra are quite similar to each other in the whole spectral range. Figure 2b shows the scores of the grape samples in the space defined by the first and second PCs which described 51.67% (PC1) and 20.57% (PC2) of the spectral variability in the data. There is not a separation between Syrah and Tempranillo samples. However, Syrah samples are more scattered than Tempranillo ones, being Tempranillo samples mainly in the right and down side of the space defined by PC1 and PC2. In this space are also shown the scores of the validation and calibration samples (Figure 2c). Although sample selection was carried out taking into account the first 8 PCs, the comparison between Figure 2b,c shows that almost all the spectral variability of samples are included in the validation and calibration sets.

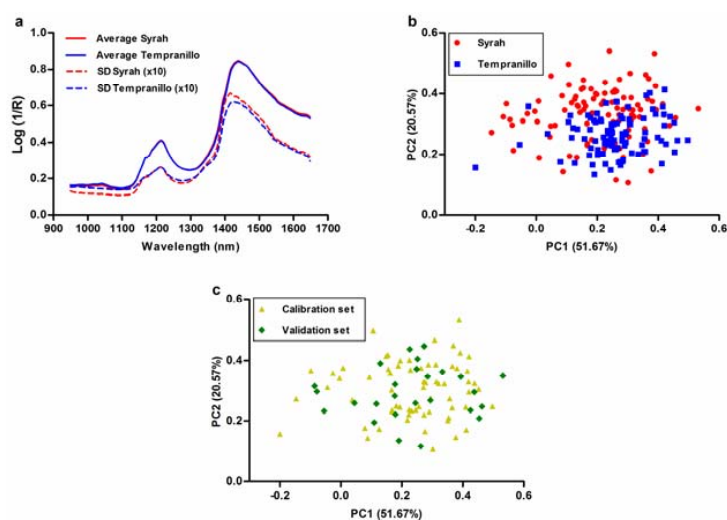


Figure 2. Description of near infrared spectra. (a) Near infrared average raw spectra and standard deviations (10 times amplified) for Syrah and Tempranillo samples. (b) Scores of the grape samples in the space defined by the first and second PCs. (c) Scores of the calibration and validation samples in the space defined by PC1 and PC2.

3.2. Chemical Analysis

The main statistical descriptors for extractable content, total content and extractability of total phenols and flavanols of the samples allocated in the validation and calibration sets were obtained (Table 1). These values are comparatively similar than those described in bibliography [10,18]. Taking into account these statistical descriptors, it can be inferred that in calibration set chemical variability is bigger than in validation one. These results are surely linked with the spectral relationship between both sample sets.

Table 1. Main statistical descriptors for reference parameters in calibration and validation sets.

Set	Reference Parameter	Maximum	Mean	Minimum	SD ¹
Calibration	EPC ²	79.92	17.14	0.67	15.39
	EFC ³	56.42	11.07	0.34	11.22
	TPC ⁴	99.97	59.40	32.90	13.51
	TFC ⁵	66.92	21.66	6.63	10.49
	ETP ⁶	80.59	28.09	0.99	20.15
	EF ⁷	89.16	42.60	2.20	25.76
	Validation	EPC ²	41.89	14.91	2.24
EFC ³		33.12	10.17	0.99	8.54
TPC ⁴		88.14	56.62	27.50	13.37
TFC ⁵		39.42	20.65	11.03	8.21
ETP ⁶		82.91	29.06	4.04	22.01
EF ⁷		93.04	44.23	7.80	25.33

¹ SD: Standard deviation; ² EPC: extractable total phenolic content (mg g⁻¹ of grape seed, expressed as gallic acid equivalents); ³ EFC: extractable flavanolic content (mg g⁻¹ of grape seed, expressed as catechin equivalents); ⁴ TPC: total phenolic content (mg g⁻¹ of grape seed, expressed as gallic acid equivalents); ⁵ TFC: total flavanolic content (mg g⁻¹ of grape seed, expressed as catechin equivalents); ⁶ ETP: extractability of total phenols (expressed as percentages); ⁷ EF: extractability of flavanols (expressed as percentages).

3.3. Quantitative Calibrations

Samples allocated into the calibration set were used to perform MPLS regressions. In these quantitative calibrations, the 66 seed spectra were used as independent (X) variables. Reference parameters (EPC, EFC, TPC, TFC, ETP and EF) previously determined for grape seed samples were used as dependent (Y) variables. The statistical parameters of the final calibration equations are shown in Table 2 where N is the number of samples used to obtain the calibration equation after eliminating samples for chemical reasons (T criterion). The mathematical treatment applied (i.e., the best of the different treatment interrogated), the range of application, and standard deviations are also shown for each reference parameter.

External validations were carried out for each selected model. For, TPC, TFC, ETP and EF all samples presented reference values within the applicability of the obtained models. However, in the case of EPC and EFC, one Syrah sample presented reference values outside of the applicability range of the obtained models. Therefore, this sample was removed from the validation set in these validation procedures. In Table 2 were also included the standard errors of prediction (SEP) in external validation obtained in the validation of each reference parameter.

For TPC and TFC, similar errors have been reported by other authors, taking into account the applicability range, for total or extractable contents of these compounds using near infrared spectroscopy [10,12,18–20]. For the interpretation of these errors it is necessary to take into account the standard error of the reference methods. These errors, for the determinations of total phenols and flavanols, are around 10% [6,7,21,22]. Therefore, these variables can be considered appropriated to be used as reference parameters. In consequence, MPLS regressions developed from grape seed NIR spectra present a good potential for a fast and reasonably inexpensive screening of total contents of total phenols and flavanols (TPC and TFC respectively) in these samples.

Table 2. Main statistical descriptors for the MPLS models developed in the NIR zone close to 950–1650 nm.

Spectral Pretreatment	Reference Parameters	T Outliers	PLS Factors	N ¹	Est. Min	SD ²	Est. Max	SEC ³	RSQ ⁴	SECV ⁵	SEP ⁶
None 2,10,10,1	EPC ⁷	5	5	61	0.00	9.17	41.80	5.13	0.69	6.45	6.79
None 2,10,10,1	EFC ⁸	6	5	60	0.00	7.59	31.80	3.50	0.79	4.21	6.12
SNV + Detrend 2,15,15,1	TPC ⁹	2	8	64	23.22	11.64	93.08	7.38	0.60	8.41	11.23
SNV + Detrend 1,5,5,1	TFC ¹⁰	3	5	63	0.00	7.19	41.62	2.17	0.91	3.62	4.85
None 2,15,15,1	ETP ¹¹	2	6	64	0.00	19.62	86.36	9.74	0.75	11.83	19.26
None 2,15,15,1	EF ¹²	0	6	66	0.00	25.76	119.87	13.50	0.73	16.67	23.47

¹ N: number of samples (calibration set); ² SD: standard deviation; ³ SEC: standard error of calibration; ⁴ RSQ: coefficient of determination (calibration set); ⁵ SECV: standard error of cross-validation (7 cross-validation groups); ⁶ SEP: standard error of prediction (external validation); ⁷ EPC: extractable total phenolic content (mg g⁻¹ of grape seed, expressed as gallic acid equivalents); ⁸ EFC: extractable flavanolic content (mg g⁻¹ of grape seed, expressed as catechin equivalents); ⁹ TPC: total phenolic content (mg g⁻¹ of grape seed, expressed as gallic acid equivalents); ¹⁰ TFC: total flavanolic content (mg g⁻¹ of grape seed, expressed as catechin equivalents); ¹¹ ETP: extractability of total phenols (expressed as percentages); ¹² EF: extractability of flavanols (expressed as percentages).

The loading plots of the MPLS models for TPC and TFC are shown in Figure 3a,b, respectively. The loadings show important features in the spectral regions around 1200 and 1400 nm. These regions are usually ascribed to combination bands of the –OH functional group and symmetric and antisymmetric stretching. Moreover, second and third overtones of C–H aromatic bond are also assigned to this band. These features can be attributed to the chemical structure of the analyzed compounds [23–25].

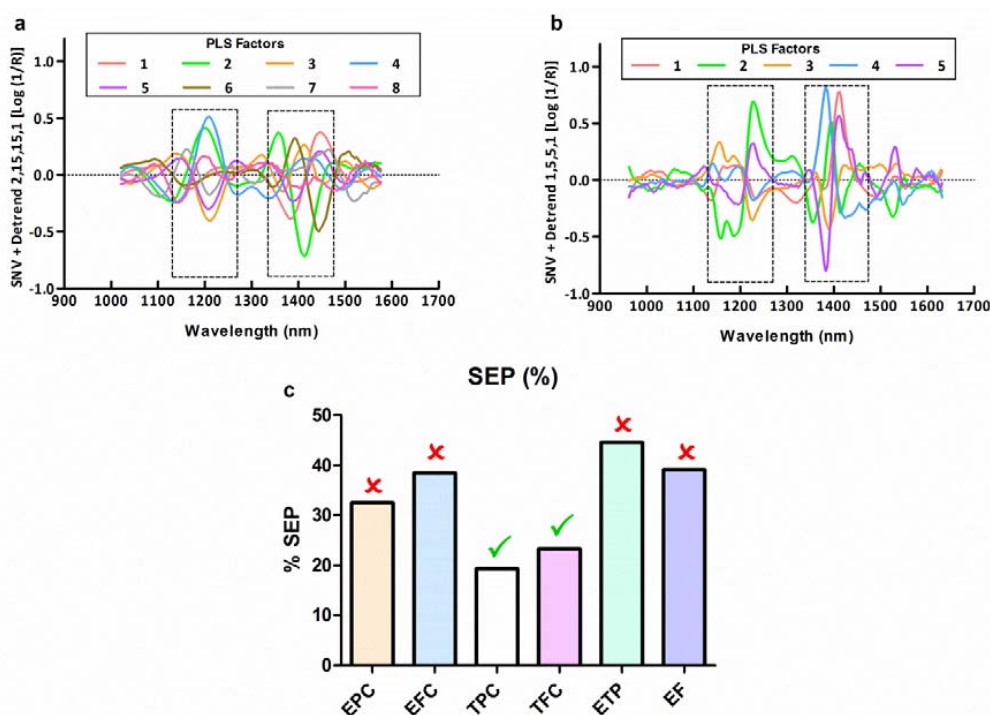


Figure 3. (a) Loading plots of the MPLS model for total phenolic content (TPC). (b) Loading plots of the MPLS model for total flavanolic content (TFC). (c) Standard errors of prediction obtained in the external validation procedure for all MPLS models carried out expressed as percentages.

These spectral regions have been identified as important regions in other similar studies. Zhang et al. [19] predict total phenols in grape seeds and they identify the regions about 1200 and 1450 nm as the regions with a high importance in the prediction. In the case of the prediction of flavanols, Ferrer-Gallego et al. [18] and Rodríguez-Pulido et al. [10] also declare the importance of the spectral regions about 1100–1300 and 1400 nm. In the case of EPC, EFC, ETP and EF, the standard

errors of prediction obtained in the external validation procedure were too high (Figure 3c), not being possible the correct prediction of these parameters by the use of MPLS regressions. Due to the high importance of these parameters, other approaches were carried out for ETP and EF in order to link the phenolic extractability in grape seeds to their spectral features in the near infrared region.

3.4. Qualitative Analysis for the Control of the Extractability of Phenolic Compounds

Grape seed samples were sorted according to their extractability of phenolic compounds (ETP and EF). For this purpose, a k-means analysis was carried out. Taking into account these two variables, k-means cluster analysis sorted grape seed samples in two different groups. Then, these groups were named as low and high extractability levels. Samples of calibration and validation sets were both sorted. By the application of the k-means method, they were obtained the number of seed samples classified as samples with low or high extractability and, then, the mean and standard deviation for ETP and EF were obtained for these samples (Table 3).

Table 3. Extractability levels of total phenols and flavanols for grape seed samples allocated in calibration and validation sets. Means and standard deviations are shown.

Set	Samples	N ¹	ETP ²		EF ³	
			Mean	SD	Mean	SD
Calibration	All	66	28.09	20.15	42.60	25.76
	Low	36	12.93	8.08	22.39	13.83
	High	30	46.30	14.24	66.84	11.87
Validation	All	26	29.06	22.01	44.23	25.33
	Low	14	13.76	6.20	24.73	10.71
	High	12	46.91	20.24	66.97	16.58

¹ N: number of samples; ² ETP: extractability of total phenols (expressed as percentages); ³ EF: extractability of flavanols (expressed as percentages).

Afterwards, an LDA was carried out in order to discriminate samples according their extractability level (high or low). LDA was carried out using the scores of the 8 first PCs obtained from near infrared hyperspectral data, which had previously been used for the sample selection (expressed as PC1 to PC8 for simplicity). Results of this LDA are shown in Table 4. The results of the classification of grape seed samples according to their extractability level of phenolic compounds reveal a good percentage of correctly classified samples. The model classifies correctly the 83.3% of the samples in leave-one-out cross-validation and the 76.9% of the samples in external validation. Table 4 also shows the lineal discriminant function. If the scores of the 8 first PCs obtained from near infrared hyperspectral data are known for other samples, this discrimination function can be applied for the classification of these grape seed samples according to their extractability. Respectively, the standardized canonical coefficients (β) for the scores of the first 8 PCs are: 0.678, -0.628 , 0.547, 0.295, -0.187 , -0.520 , -0.042 and 0.596. Therefore, the variables with the greatest influence on the discrimination are PC1 and PC2 scores.

Table 4. Samples correctly classified by the LDA in the leave-one-out cross-validation and in the external validation. The obtained lineal discriminant function is also shown.

Samples	Leave-One-Out Cross-Validation		External Validation	
	Samples Correctly Classified	% of Samples Correctly Classified	Samples Correctly Classified	% of Samples Correctly Classified
Low	30/36	83.33	12/14	85.7
High	25/30	83.33	8/12	66.67
All	55/66	83.33	20/26	76.92
Discriminant function	$D = -17.316 + 4.735PC1 - 6.993PC2 + 9.199PC3 + 8.307PC4 - 6.770PC5 - 21.565PC6 - 1.608PC7 + 24.292PC8$			

If the loadings of the PCA are analyzed, important features are found in the spectral regions around 1200 and 1400 nm (data not shown). As mentioned above, similar results were found in the loading plots of the MPLS models. Therefore, the importance of these spectral regions is confirmed.

3.5. Application of the Developed Tools in the Control of Grape Seed Phenols

3.5.1. Total Phenolic and Flavanolic Contents

By applying the quantitative calibration models developed in previous sections, total phenolic and total flavanolic contents were predicted for the whole set of collected grape seeds samples with the exception of the spectral outlier. Models described in Table 2 were applied to a total of 199 samples (99 Syrah and 100 Tempranillo samples) for the prediction of TPC and TFC. Figure 4 shows the distributions of Syrah and Tempranillo grape seeds in different total phenolic content (a and c) and total flavanolic content (b and d). It can be appreciated that, in all cases, the two parameters describe a Gaussian bell-shaped distribution. This confirms the heterogeneity found within the same ripeness stage for the above-said parameters. It is noteworthy that similar results were found in a previous study for extractable polyphenols in Syrah and Tempranillo grape skin [14].

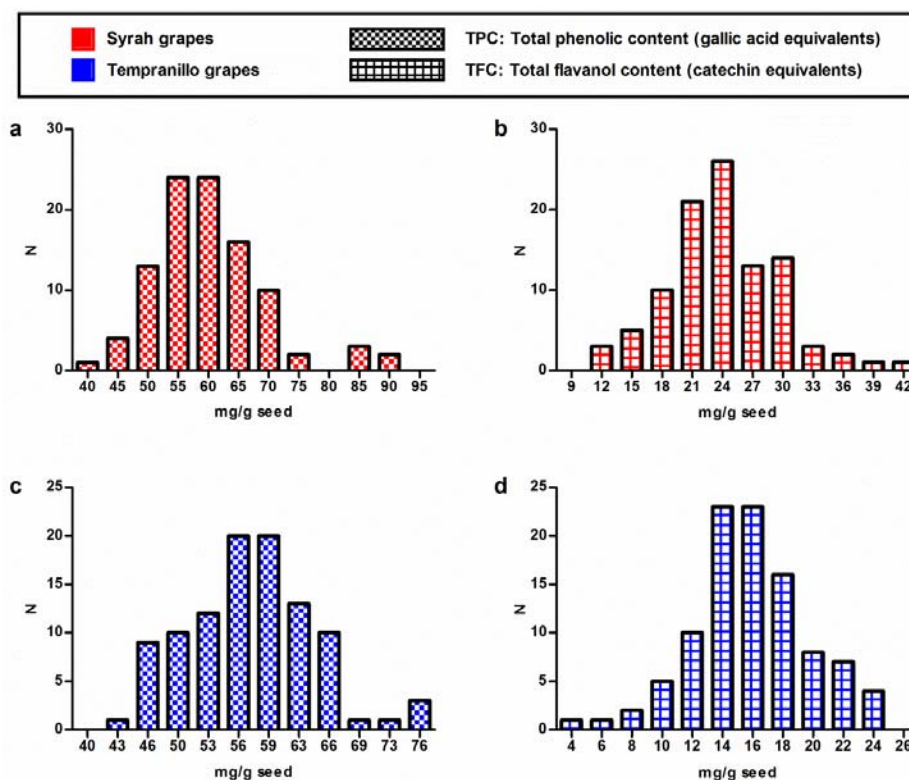


Figure 4. Distributions of Syrah and Tempranillo grape seeds in different total phenolic content (a,c) and total flavanolic content (b,d).

Basic statistical descriptors of predicted values (mean and standard deviation) indicate higher values of TPC and TFC for Syrah samples than for Tempranillo. For TPC (expressed as gallic acid equivalents) these descriptors were for Syrah samples, respectively, 60.14 mg g^{-1} and 9.59 mg g^{-1} and for Tempranillo samples, 57.31 mg g^{-1} and 6.97 mg g^{-1} . Whereas for TFC (expressed as catechin equivalents), these statistics were for Syrah samples, respectively: 24.21 mg g^{-1} and 5.51 mg g^{-1} and for Tempranillo samples 15.98 mg g^{-1} and 3.84 mg g^{-1} .

In Figure 5a, samples are plotted according to their TPC and TFC values. It can be observed that, in most cases, Syrah samples have a higher amount of TFC than Tempranillo samples. Regarding to

TPC, differences are lower than in the previous case, although five Syrah samples show really high total contents.

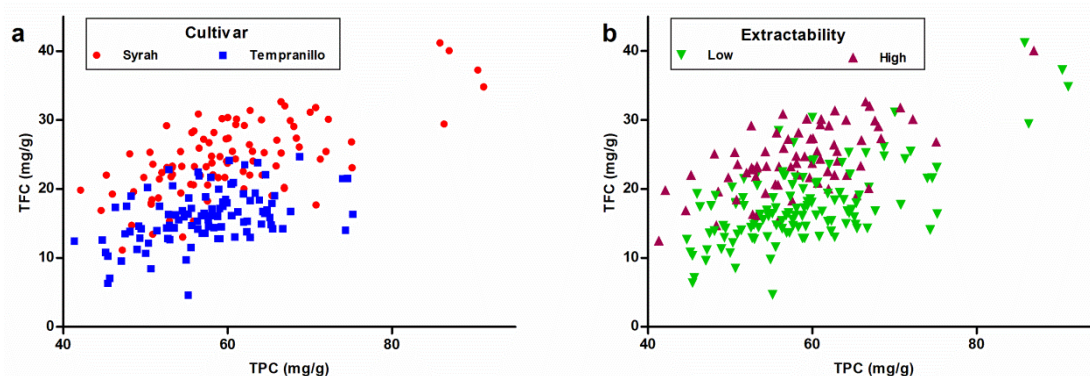


Figure 5. Representation of grape seed samples according their predicted total phenolic content (TPC) and total flavanolic content (TFC). Samples are codified as (a) Syrah or Tempranillo samples or (b) samples with low or high phenolic extractabilities.

3.5.2. Phenolic Extractability Levels

In order to determine the extractability level for the whole grape seed set (spectral outlier was not taken into account), the discriminant function previously obtained (Table 4) was applied. For these samples, scores of the first 8 PCs were introduced in the discriminant function and samples were classified according to their phenolic extractability level as samples with low or high extractability level.

As result, 127 grape seeds were classified as samples with low extractability level and the remaining 72 seeds samples as samples with high extractability level. Among high extractability samples, 69 were Syrah samples whereas only 3 were Tempranillo. In consequence, low extractability group was composed of 30 Syrah and 97 Tempranillo samples. Those results indicate higher extractability of phenolic compounds in Syrah than in Tempranillo seeds. This higher extractability can be attributed to the physiological differences among both varieties. For example, Tempranillo grapes generally present a more mature state than other varieties on similar dates. In this way, Tempranillo grapes present more mature seeds than Syrah grapes and it is well-known that phenolic extractability in grape seeds decreases during ripening due to, among others, changes in the cell wall polysaccharide structure and lignification [10,13,26].

In Figure 5b, samples of different extractability levels are plotted separately according to their TPC and TFC values. It is noteworthy that samples with the highest total contents (TPC and TFC) are not always samples with a high extractability level. Although these samples have high total contents, they do not necessarily release phenolic compound easier than samples with a lower total amount of these compounds. Nevertheless, in a large number of cases and especially for TFC, samples with high content are samples of high extractability.

4. Conclusions

Quantitative models carried out in this work, from near infrared hyperspectral images, provide good results for the screening of total phenolic and flavanolic contents in grape seeds in a fast and reasonably inexpensive way. These models have errors which are comparatively similar to the errors previously reported for these parameters in bibliography. Moreover, spectral region with high importance in the prediction of these parameters have been identified and the heterogeneity of total polyphenols within the same ripeness stage has been observed.

Qualitative models have also been carried out for the identification of grape seed samples with low or high phenolic extractability levels. The model classifies correctly the 83.3% of the samples in leave-one-out cross-validation and the 76.9% of the samples in external validation. By the application

of the developed model, higher extractabilities of phenolic compounds have been found in Syrah than in Tempranillo seeds.

In this preliminary study, a number of simplifications have been adopted to obtain the feasibility of using the hyperspectral imaging in the control of phenolic extractability in grape seeds. These simplifications are intended to simulate a post-fermentative process. In future studies, it would be interesting to recalculate these chemometric models for pre-fermentative or fermentative processes. For example, ethanol or temperature variations, regular agitation, changes in pH, production of enzymes or the formation of new polyphenols during the fermentation may be taken into account.

Author Contributions: Conceptualization, J.N.-B.; Funding acquisition, F.J.H.; Investigation, B.B.-B.; Methodology, J.M.H.-H.; Supervision, J.M.H.-H.; Validation, B.B.-B.; Writing—original draft, J.N.-B.; Writing—review & editing, F.J.H..

Funding: This research was funded by Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, grant number AGL2017-84793-C2 and by Universidad de Sevilla, grant numbers VPPI-II.2, VPPI-II.4.

Acknowledgments: The authors thank the technical staff of Biology Service (Servicios Generales de Investigación (SGI), Universidad de Sevilla).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Waterhouse, A.L. *Wine Phenolics*; The New York Academy of Sciences: New York, NY, USA, 2002; pp. 21–36.
2. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Doneche, B.; Lonvaud, A.; Glories, Y.; Maujean, A.; Branco, J.M. *Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications*; Wiley & Sons: West Sussex, UK, 2006.
3. Ristic, R.; Iland, P.G. Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 43–58. [[CrossRef](#)]
4. Jara-Palacios, M.J.; Gordillo, B.; González-Miret, M.L.; Hernanz, D.; Escudero-Gilete, M.L.; Heredia, F.J. Comparative Study of the Enological Potential of Different Winemaking Byproducts: Implications in the Antioxidant Activity and Color Expression of Red Wine Anthocyanins in a Model Solution. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6975–6983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*; Wiley & Sons: West Sussex, UK, 2006.
6. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
7. Vivas, N.; Glories, Y.; Lagune, L.; Saucier, C.; Augustin, M. Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamaldéhyde. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1994**, *28*, 319–336. [[CrossRef](#)]
8. Nogales-Bueno, J.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Baca-Bocanegra, B.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.J.; Hernández-Hierro, J.M. Hyperspectral Imaging—A Novel Green Chemistry Technology for the Oenological and Viticultural Sectors. In *Agricultural Research Updates*; Gorawala, P., Mandhatri, S., Eds.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA, 2016; Volume 12, pp. 45–56.
9. Chen, S.; Zhang, F.; Ning, J.; Liu, X.; Zhang, Z.; Yang, S. Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. *Food Chem.* **2015**, *172*, 788–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Rodríguez-Pulido, F.J.; Hernández-Hierro, J.M.; Nogales-Bueno, J.; Gordillo, B.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.J. A novel method for evaluating flavanols in grape seeds by near infrared hyperspectral imaging. *Talanta* **2014**, *122*, 145–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Nogales-Bueno, J.; Hernández-Hierro, J.M.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Heredia, F.J. Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: A preliminary approach. *Food Chem.* **2014**, *152*, 586–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jara-Palacios, M.J.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Hernanz-Vila, M.D.; Escudero-Gilete, M.L.; Heredia, F.J. Determination of phenolic substances of seeds, skins and stems from white grape marc by near-infrared hyperspectral imaging. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2016**, *22*, 11–15. [[CrossRef](#)]

13. Nogales-Bueno, J.; Baca-Bocanegra, B.; Rooney, A.; Hernández-Hierro, J.M.; Byrne, H.J.; Heredia, F.J. Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Food Chem.* **2017**, *232*, 602–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nogales-Bueno, J.; Baca-Bocanegra, B.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Heredia, F.J.; Hernández-Hierro, J.M. Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins. *Food Chem.* **2015**, *172*, 559–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H. Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Appl. Spectrosc.* **1985**, *39*, 491–500. [[CrossRef](#)]
16. Dhanoa, M.S.; Lister, S.J.; Barnes, R.J. On the Scales Associated with Near-Infrared Reflectance Difference Spectra. *Appl. Spectrosc.* **1995**, *49*, 765–772. [[CrossRef](#)]
17. Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O. *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*; NIRSystems: Silver Spring, MD, USA, 1995.
18. Ferrer-Gallego, R.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Feasibility study on the use of near infrared spectroscopy to determine flavanols in grape seeds. *Talanta* **2010**, *82*, 1778–1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Zhang, N.; Liu, X.; Jin, X.; Li, C.; Wu, X.; Yang, S.; Ning, J.; Yanne, P. Determination of total iron-reactive phenolics, anthocyanins and tannins in wine grapes of skins and seeds based on near-infrared hyperspectral imaging. *Food Chem.* **2017**, *237*, 811–817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Cozzolino, D.; Kwiatkowski, M.J.; Parker, M.; Cynkar, W.U.; Dambergs, R.G.; Gishen, M.; Herderich, M.J. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 73–80. [[CrossRef](#)]
21. Slinkard, K.; Singleton, V.L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am. J. Enol. Vitic.* **1977**, *28*, 49–55.
22. Ivanova, V.; Stefova, M.T.; Chinnici, F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J. Serbian Chem. Soc.* **2010**, *75*, 45–49. [[CrossRef](#)]
23. Osborne, B.G.; Fearn, T.; Hindle, P.T. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*; Longman Scientific and Technical: Harlow, UK, 1993.
24. Siesler, H.W.; Ozaky, Y.; Kawata, S.; Heise, H.M. *Near Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002.
25. Hernández-Hierro, J.M.; Nogales-Bueno, J.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Heredia, F.J. Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 9804–9809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bautista-Ortín, A.B.; Jiménez-Pascual, E.; Busse-Valverde, N.; López-Roca, J.M.; Ros-García, J.M.; Gómez-Plaza, E. Effect of Wine Maceration Enzymes on the Extraction of Grape Seed Proanthocyanidins. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 2207–2212. [[CrossRef](#)]



CAPÍTULO 3: APLICACIÓN DEL ANALISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL EN EL INFRARROJO CERCANO A LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO EXTRAIBLE DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN SUBPRODUCTOS DE TONELERÍA

En: Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José: *Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage byproduct by near infrared hyperspectral imaging*. Food Chemistry 2018. Vol. 244. Pág. 206–212, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.027> .

1. Antecedentes

El procesamiento de la madera para la elaboración de barricas genera subproductos que, en la mayoría de los casos, se eliminan directamente como desecho. Sin embargo, en el campo de la enología, los desechos de barricas de roble se postulan como un producto interesante debido a su potencial para liberar compuestos de alto valor añadido para el vino durante procesos de maceración, tanto fermentativa como postfermentativa.

La madera es la segunda gran fuente natural de fenoles para el vino. Además de compuestos aromáticos, aporta al vino ácidos fenólicos y taninos hidrolizables, que no se encuentran naturalmente en la uva. Estos compuestos pueden participar en la estabilización del color del vino mediante procesos de copigmentación y protección de los antocianos frente a la oxidación (Chassaing, et al., 2010; Jourdes, et al., 2011; Vivas, et al., 1996). Además, juegan un papel importante en la astringencia de los vinos (Ribéreau-Gayon, et al., 2006; Zamora, 2003).

Las características finales del vino dependen no solo de la cantidad de compuestos fenólicos que contiene la madera, sino también de la cantidad de estos compuestos que pasarán a formar parte del vino tras el proceso de maceración. Existe gran heterogeneidad de estos compuestos en la madera en función del tipo de roble, el origen geográfico, el cultivo o el grado tostado de la madera entre otros (Del Álamo Sanza, et al., 2006; Del Alamo Sanza, et al., 2004; Fernández de Simón, et al., 2010; Frangipane, et al., 2007), incluso, diferentes zonas anatómicas de la misma madera pueden diferir en términos de contenido fenólico total y contenido fenólico extraíble (Colares, Pastore, Coradin, Marques, Moreira, Alexandrino, et al., 2016). En cualquier caso, sería de interés disponer de un método rápido que permita el análisis del contenido fenólico extraíble de las virutas de madera de roble añadidas al vino dada la importancia de este parámetro en la elaboración de vinos.

La espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) es una técnica rápida y no destructiva que ha sido utilizada con buenos resultados para desarrollar métodos que puedan reemplazar las técnicas tradicionales de análisis en distintas matrices de interés en agricultura y enología. En el caso concreto de la madera, se encuentra descrito en la literatura el uso de técnicas de infrarrojo cercano convencional para la determinación de fenoles totales en madera de roble (Zahri, et al., 2008) y para la clasificación de duelas completas y su posterior uso en barricas, teniendo en cuenta el contenido fenólico de las mismas (Giordanengo, et al., 2009; Michel, Jourdes, Le Floch, Giordanengo, Mourey, y Teissedre, 2013). Sin embargo, no se han encontrado referencias de la utilización del análisis de imagen hiperespectral NIR para el análisis de madera de roble con fines enológicos, si bien sí ha sido empleada en el análisis de otras variedades y con otros fines (Lestander, et al., 2012; Thumm, et al., 2010). Por tanto, el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano se puede considerar un candidato válido para la estimación del contenido fenólico extraíble de virutas de roble americano obtenidas como subproducto de tonelería. Este modelo permitirá realizar una selección adecuada de la madera de roble, cualitativa y cuantitativamente hablando, para conseguir el efecto deseado en el vino mediante la adición de copigmentos externos.

2. Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido el desarrollo de un método rápido y no destructivo, mediante análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano, para la estimación del contenido extraíble de fenoles totales en viruta cruda de roble americano, subproducto de tonelería.

3. Parte experimental

Para la realización de este estudio se han utilizado muestras de viruta cruda de roble americano (*Quercus alba* L.), subproducto de tonelería, suministradas por Tonelería Salas S.L. (Bollullos Par del Condado, Huelva, España). Con el objetivo de obtener un conjunto de muestras representativo, se eligieron 4 puntos diferentes del proceso de fabricación de las barricas: serrado automático de las duelas (A), serrado manual de las duelas (B), cepillado de las duelas (C) y cepillado de los cantos de los fondos de las barricas (D), y se tomaron muestras periódicamente entre junio de 2015 y enero de 2016, hasta completar un total de doscientas muestras.

Las muestras que pertenecen a los conjuntos A, B y C corresponden a diferentes procesados de las duelas pero siempre en la dirección longitudinal de las fibras. Sin embargo, las muestras del grupo D son el resultado de un procesado de las duelas en la dirección transversal de las fibras.

Tras la recepción, las muestras se tamizaron y se realizó inmediatamente el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano siguiendo la metodología descrita por Hernández-Hierro, et al. (2013). La imagen de cada muestra se sometió a una calibración de doble punto, para ello se adquirieron imágenes de un material de referencia y de la corriente oscura del equipo, señal que recoge el detector cuando no recibe luz. El espectro medio de cada una de ellas se almacenó en una única matriz de datos (950–1650 nm). Tras la adquisición espectral, las muestras se colocaron en bolsas herméticas y se almacenaron en un lugar seco hasta la realización de los correspondientes análisis químicos.

Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el capítulo anterior se desarrolló un modelo para la estimación del contenido extraíble de fenoles totales en viruta cruda de roble americano.

En primer lugar, la matriz espectral de datos se sometió a un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de reducir su dimensión y realizar una selección espectral de muestras que permitiera reducir el número de ellas manteniendo la variabilidad espectral de la matriz original. En este caso se consigue explicar el 99.21% de la variabilidad espectral de los datos originales teniendo en cuenta 8 componentes principales y se encontraron 5 *outliers* espectrales que fueron eliminados del conjunto de muestras estudiado. Las muestras restantes se ordenaron de acuerdo a su distancia de Mahalanobis (H) y se agruparon todas aquellas que tuvieran una distancia de Mahalanobis a la muestra vecina (NH) menor que 0.9, obteniéndose 36 grupos con diferentes características espectrales. 15 de los 36 grupos creados estaban formados por una única muestra y 3 de ellos agruparon un número elevado de muestras (más de 10 muestras). Con el fin de lograr conjuntos representativos de calibración y validación, los grupos más numerosos se dividieron en 3 subgrupos a partir de los valores de NH ($NH \leq 0.3$, $0.3 \leq NH \leq 0.6$, $0.6 \leq NH \leq 0.9$). Para construir los conjuntos de calibración y validación, se seleccionó una muestra de cada uno de los grupos/subgrupos obteniéndose así un set de calibración constituido por 42 muestras en el cual estaba representada toda la variabilidad espectral del conjunto original de 195 muestras y un set de validación constituido por 21 muestras (15 de los grupos creados contenían una única muestra).

A continuación, se determinó el contenido extraíble de fenoles totales para las 63 muestras de viruta seleccionadas (calibración y validación). Para ello las muestras fueron maceradas durante tres días en vino sintético, una disolución en base acuosa con un 12.5% de etanol, 4 g L⁻¹ de ácido tartárico y un pH de 3.6. Seguidamente, se determinó la concentración de los fenoles totales presentes en los extractos, utilizando el método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton, et al., 1965).

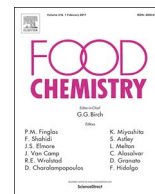
A partir de los datos espectrales y el parámetro de referencia calculado para el conjunto de calibración, se desarrolló un modelo de calibración mediante regresión por mínimos cuadrados

parciales modificada (MPLS) que permite la estimación del contenido extraíble de fenoles totales en viruta cruda de roble americano en el intervalo de 0-65 mg g⁻¹ y se realizó la validación externa del modelo usando las muestras seleccionadas para tal efecto. Este modelo, desarrollado utilizando pretratamiento Detrend 1.5.51 como el más adecuado, presenta un coeficiente de determinación (RSQ) de 0.89 y un error estándar de predicción (SEP) de 6.3 mg g⁻¹ de viruta (19.40%).

Por último, el método desarrollado se utilizó para predecir el contenido extraíble de fenoles totales en todas las muestras (195), sin tener en cuenta los *outliers* espectrales. Los resultados obtenidos muestran una variabilidad sustancial de este parámetro dentro de cada grupo de muestras. El contenido extraíble de fenoles totales es mayor en las muestras de los conjuntos A, B y C, obtenidas mediante procesados de las duelas en la dirección longitudinal de las fibras, que en aquellas obtenidas tras un procesado de las duelas en la dirección transversal (D).

4. Conclusiones

- En la elaboración de vinos, la utilización de residuos de madera de roble, obtenidos durante el proceso de fabricación de barricas, puede considerarse una estrategia interesante para la revalorización de este subproducto gracias a la extracción de compuestos de elevado interés para el vino como son los polifenoles.
- El modelo MPLS desarrollado, a partir del análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano, permite estimar el contenido extraíble de fenoles totales procedentes de viruta cruda de roble americano de forma rápida y razonablemente económica.
- La aplicación del modelo desarrollado revela una variabilidad sustancial en el contenido fenólico extraíble dentro de cada grupo de muestras, resultado que corrobora la heterogeneidad fenólica de la madera de roble descrita en bibliografía. Se observan diferencias en el contenido extraíble de compuestos fenólicos según la dirección del procesado de las duelas: longitudinal o transversal a las fibras; lo que podría estar relacionado con diferencias estructurales y/o morfológicas entre los dos grupos de muestras.



Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage byproduct by near infrared hyperspectral imaging



Berta Baca-Bocanegra, Julio Nogales-Bueno, José Miguel Hernández-Hierro, Francisco José Heredia*

Food Colour and Quality Laboratory, Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Byproduct
Oak
Near infrared hyperspectral imaging
Phenolic compounds

ABSTRACT

Extractable total phenolic content of American non-toasted oak (*Quercus alba* L.) shavings has been determined using near infrared hyperspectral imaging. A like-wine model solution was used for the simulated maceration procedure. Calibrations were performed by partial least squares regression (MPLS) using a number of spectral pre-treatments. The coefficient of determination of wood for extractable total phenolic content was 0.89, and the standard error of prediction was 6.3 mg g⁻¹. Thus, near infrared hyperspectral imaging arises as an attractive strategy for predicting extractable total phenolic content in the range of 0–65 mg g⁻¹, of great relevance from the point of view of quality assurance regarding wood used in the wine sector. Near infrared hyperspectral imaging arises as an attractive strategy for the feasibility of enhancing the value of cooperage byproduct through the fast determination of extractable bioactive molecules, such as polyphenols.

1. Introduction

Wood is the second great natural source of phenols for wine. In addition to aromatic compounds, wood releases to wine phenolic acids and hydrolysable tannins, which are not naturally found in grape. These compounds are involved in the stabilization of wine color by means of co-pigmentation processes and protection against oxidation and they play an important role in the astringency of wines (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2000; Zamora, 2003).

Oak wood has been used for centuries for the construction of barrels where the wine is stored during aging. Although the original function of the barrels was the mere storage and transport of wine, it has been shown that during barrel aging, wine undergoes a series of transformations leading to important changes in aroma, color, taste, and astringency (Glabasnia & Hofmann, 2006; Puech, Feuillat, & Mosedale, 1999; Zamora, 2003). Since the European Community approved the addition of wood chips to produce accelerated aging (CE 2165/2005 and CE 1507/2006), it has become an extended practice (Bautista-Ortín et al., 2008; Del Álamo, Nevares, Gallego, Martín, & Merino, 2008; Frangipane, Santis, & Ceccarelli, 2007; Guchu, Díaz-Maroto, Pérez-Coello, González-Viñas, & Ibáñez, 2006; Rodríguez-Bencomo, Ortega-Heras, Pérez-Magarino, & González-Huerta, 2009).

Quercus genus is widely distributed all over the world. However, the main producing areas of the three oak species used for the production of barrels are France and the United States of America. In fact, in

cooperated the terms French oak and American oak are widely used. Alternative sources of wood for barrel making have been assayed, including mainly chestnut, acacia and cherry, in an effort to give a particular personality to aged wines (Alañón, Castro-Vázquez, Díaz-Maroto, & Pérez-Coello, 2012; De Rosso, Panighel, Vedova, Stella, & Flamini, 2009; Fernández de Simón, Martínez, et al., 2014; Fernández de Simón, Sanz, et al., 2014; Rodríguez-Bencomo et al., 2009). Even so, most of the oak barrels that are marketed at this time continue to be oak wood and, in particular, American white oak (*Quercus alba* L.) and European oak (*Quercus robur* L.).

Winemakers are continuously looking for high quality wines. In geographical areas with typical climatological conditions of warm climate, such as Andalucía, the stressful climate increases the difficulty of obtaining high quality red wines because of color instability over time (Gordillo et al., 2012). In these warm regions, the phenolic maturity does not coincide with the technological maturity of grapes, therefore, at the moment of harvesting, different levels of both phenolic and sugar maturity exist (Mira de Orduña, 2010; Mori, Sugaya, & Gemma, 2005). Thus, copigmentation phenomena, which contribute to color stabilization, are hampered by the shortfall of pigments and copigments (Boulton, 2001). Taking that into account, an extra contribution of phenolic compounds might be necessary to partially solve the problem. The external addition of phenolic compounds from natural sources to the musts has been reported for the purpose of color stabilization (Canals, Llaudy, Canals, & Zamora, 2008; Cejudo-Bastante et al., 2016;

* Corresponding author.

E-mail address: heredia@us.es (F.J. Heredia).

Gordillo, Cejudo-Bastante, Rodríguez-Pulido, Gonzalez-Miret, & Heredia, 2013; Gordillo et al., 2014; Pedroza, Carmona, Alonso, Salinas, & Zalacain, 2013). However, the use of raw wood shavings, cooperage byproduct, to get high quality red wines is not so frequent.

Wood processing for the elaboration of barrels generates byproducts which could be burned to meet energy needs in the wood industries but in most cases they are directly disposed as waste products. It is known that cooperage byproduct contain many compounds whose extraction could create new business opportunities. In this context, oak barrel-shoot wastes seem to be an interesting product due to its potential to release high added value compounds for wine.

Factors such as oak species, geographic origin, seasoning and toasted degree have been shown to affect the chemical composition of the oak wood used (Del Álamo Sanza, Nevares Domínguez, Cárcel Cárcel, & Navas Gracia, 2004; Del Álamo Sanza & Nevares Domínguez, 2006; Fernández de Simón, Cadahía, del Álamo, & Nevares, 2010; Frangipane et al., 2007) and even various anatomical parts of wood may differ in terms of concentration and composition (Colares et al., 2016). However, the characteristics of the final wines depend not only on the composition of the oak wood used but also on the amount of phenolic compounds that may be extracted from wood to the must. This transfer processes could be affected by contact surface between wine and wood, alcoholic degree, duration time etc. The contact surface depends on the size of the oak fragment and on the amount used (Arapitsas, Antonopoulos, Stefanou, & Dourtoglou, 2004; Bautista-Ortín et al., 2008).

Due to the importance in the different productive sectors, the qualitative and quantitative characterization of woods applying fast and efficient analytical methods has been required. Spectroscopic methods based on near-infrared spectroscopy (NIR) have shown great potential for qualitative and quantitative analyses of wood. The rapid assessment of the chemical composition using NIR in applications related to the quality has provided an increasing number of publications for industrial applications in this area (Da Silva et al., 2013; Jones, Schimleck, Peter, Daniels, & Clark, 2006; Sun, Liu, Liu, & Yang, 2011; Yao et al., 2010). In a further step, near infrared hyperspectral imaging has also been applied for analyses of wood (Lestander, Geladi, Larsson, & Thyrel, 2012; Thumm, Riddell, Nanayakkara, Harrington, & Meder, 2010). References for the use of this technique in the analysis of byproducts of oak wood for oenological purposes have not been found, although in the literature the use of conventional near infrared techniques is described for the quantification of oak wood extractives (Michel et al., 2013; Zahri et al., 2008) and for the correlations between NIR quantification and classification with extractive level in wood, (Giordanengo et al., 2009). Correlation between oak wood extractives and oxygen consumption of wine aged in contact of wood in relation of the classified wood has been already reported in some studies (Michel et al., 2016; Navarro et al., 2016). In none of these studies, the assignment of these compounds from wood to wine is estimated by the use of spectral techniques recording the spectrum of the wood. A rapid estimation of wood extractable content of phenolic compounds could assist in selecting oak wood suited for improving wine quality through the addition of external copigments to wine. For the same purpose near-infrared hyperspectral imaging has been applied previously in our lab in order to predict different parameter in grapes (Hernández-Hierro, Nogales-Bueno, Rodríguez-Pulido, & Heredia, 2013; Nogales-Bueno, Baca-Bocanegra, Rodríguez-Pulido, Heredia, & Hernández-Hierro, 2015; Nogales-Bueno, Hernández-Hierro, Rodríguez-Pulido, & Heredia, 2014).

The aim of this study is to look at the feasibility of enhancing the value of cooperage byproduct through the extraction of bioactive molecules, such as polyphenols. To this end near infrared hyperspectral imaging has been used for the screening of the extractable content of phenolic compounds in raw wood.

2. Material and methods

2.1. Samples

American non-toasted oak (*Quercus alba* L.) shavings, cooperage byproduct, were used for this study. Samples were provided by Tonelería Salas S.L. (Bollullos Par del Condado, Huelva, Spain). Wood staves were seasoned under natural conditions in the open air during 24 months approximately before being used in the process of making barrels. In order to achieve representative sample sets, the samples were taken at 4 different points in the process of making barrels, so four samples were collected at each date (A, B, C and D). Samples belonging to A, B and C groups are generated by different sawing processes of the staves but always in the longitudinal direction of the fibers. In detail, an automatic or manual processing of the staves is the only difference between the samples A and B respectively. With respect to the group D, the samples are the result of a processing of the staves in the transversal direction of the fibers. All sampling points are pre-molded and pre-toasted of the staves. Samples were collected periodically, between June of 2015 and January of 2016. Two hundred samples were collected during the aforesaid period. Upon receipt, the samples were sieved and subjected to the hyperspectral analysis. Wood shaving samples were screened using 2 mm and 10 mm mesh sieves placed in tandem. Only shaves of each sample which were retained between them were taken into account in the assay. After that, wood shavings were placed in stoppered plastics bags and stored in a dry chamber until use.

2.2. Hyperspectral image acquisition

Hyperspectral imaging device (Infaimon S.L., Barcelona, Spain) comprised a Xenics® XEVA-USB InGaAs camera (320 × 256 pixels; Xenics Infrared Solutions, Inc., Leuven, Belgium), a spectrograph (Specim ImSpector N17E Enhanced; Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland) covering the spectral range between 900 and 1700 nm (spectral resolution of 3.25 nm), two 70 W tungsten iodine halogen lamps (Prilux, Barcelona, Spain) mounted as source light, a mirror scanner (Spectral Imaging Ltd.) and a computer system. The hyperspectral image of each sample on a polyethylene plastic was recorded. Equipment and procedure used to image recording are described in detail elsewhere in Hernández-Hierro et al. (2013).

After calibration and segmentation processes, the average spectral profile for each sample was saved. Noisy wavebands at both extremes of the spectra range were removed and only spectral data in the resulting effective wavelength 950–1650 nm regions were used in data analysis due to reduced efficiency outside this range in the used device.

2.3. Extractable total phenolic content

Wood shavings were immersed in a model wine hydroalcoholic solution (4 g L⁻¹ tartaric acid, 12.5% ethanol, adjusted at pH 3.6 with NaOH 0.5 M) for a maceration period of 72 h. Oak wood shavings were added to the wine-like solution in a 4 g L⁻¹ ratio. The supernatant was used in the analysis. Extractable total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method (Singleton & Rossi, 1965). For quantification, results were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of wood.

2.4. Image processing and data analysis

2.4.1. Image processing

Prior to the qualitative and quantitative analysis, a discriminant method was applied to the shaving images to isolate the shavings from other parts of the image. Firstly, a set of reflectance spectra belonging to shaving and background (regions of interest (ROIs)) were selected to develop a stepwise lineal discriminant model. The aforementioned discriminant model classified each pixel into two classes (sample or no

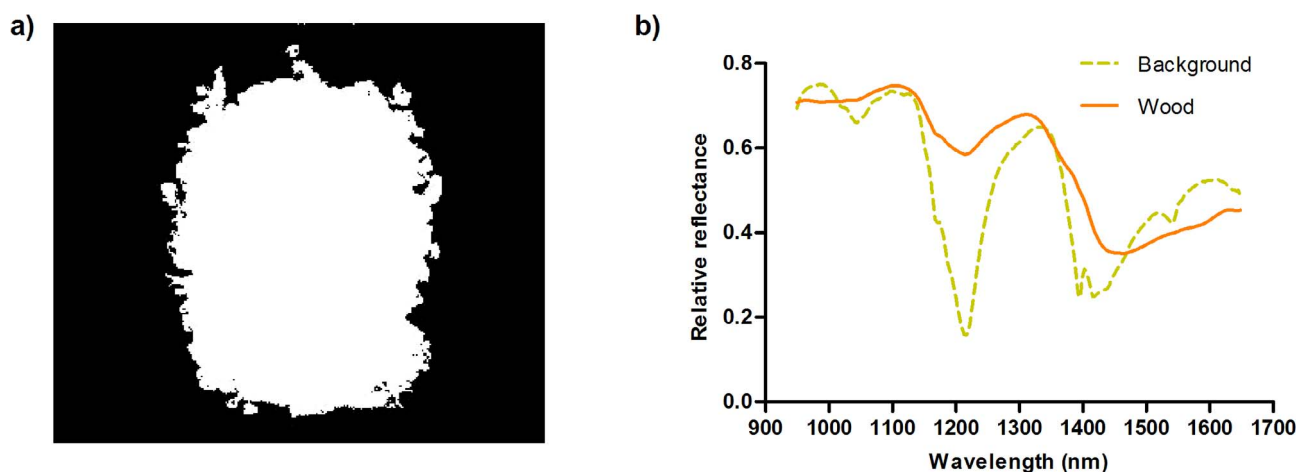


Fig. 1. Obtained mask after the segmentation procedure (a) and spectra of raw wood and background (b).

sample pixel) using the reflectance values from seven wavelengths (1073, 1177, 1216, 1396, 1445, 1527 and 1540 nm) as can be seen in Fig. 1a. Fig. 1b shows the average spectra belonging to shavings and background (a homogeneous surface composed of polyethylene). After calibration and segmentation processes, the average spectrum of the wood region was extracted and then transformed into $\text{Log}(1/R)$ units. Although the spatial dimensions has not been used directly, this information is conveyed through the averaged value. The procedure was repeated for each sample and the obtained spectra were combined into the spectral matrix. Noisy wavebands at both extremes of the spectra range were removed and only spectral data in the resulting effective wavelength 950–1650 nm regions were used in data analysis due to reduced efficiency outside this range in the used device. Image treatment was carried out using Matlab (R2010b; The Math Works, Inc., USA).

2.4.2. Data analysis

Prior to quantitative analysis, an unsupervised pattern recognition technique, principal component analysis (PCA), was used in order to provide information about the latent structure of spectral matrix and to find spectral differences among all spectral samples. This method provides not only information related to spectral outliers and the distribution of samples in the newly-created space, but is also an important source of knowledge with which to create cross-validation groups used in the calibration process (Breerton, 2003; Shenk & Westerhaus, 1995). PCA was also used to select representative samples from the spectral data set. Mahalanobis distances (H) for each sample were calculated and samples were grouped according their neighborhood H values (NH).

Using the raw spectral data, testing different spectral pretreatments and allocating the corresponding extractable total phenolic to each sample, calibrations were performed by modified partial least squares regression (MPLS). In this method, the group of calibration samples is divided into a series of subsets in order to perform cross-validation to set the number of PLS factors, reduce the possibility of overfitting (Shenk & Westerhaus, 1995) and remove chemical outliers. Using the $T \geq 2.5$ criterion, samples that presented a high residual value when they were predicted were eliminated from the set. Finally, validation errors are combined into a single figure, the standard error of cross-validation (SECV).

Spectral pretreatments are usually applied to NIR raw data. Scattering effects were removed using detrending pretreatment (Dhanoa, Lister, & Barnes, 1995; Geladi, MacDougall, & Martens, 1985). Moreover, the effect of differentiation and variations in spectral ranges were tested in the development of the NIRS calibrations.

The software used was Win ISI® (v1.50) (Infrasoft International,

LLC, Port. Matilda, PA, USA). This software allowed the data pre-treatment, principal components analysis and sample selection and development of quantitative models.

3. Results and discussion

3.1. Sample selection

Sample selection was made in order to reduce the number of samples maintaining as much spectral variety as possible. To keep as much spectral information as possible, this selection was carried out from a PCA. A SNV (2,5,5,1) spectral pre-treatment was applied to the spectra of all samples in the 950–1650 nm region, where the hyperspectral system has revealed greater efficiency.

Using all spectral samples, eight principal components were taken into account. More than ninety-nine per cent of the spectral variability of the original spectral matrix was explained (99.21%). Moreover, five spectral outliers ($H > 3$) were found and removed from this matrix. In this eight-dimensional space the 195 samples were grouped according a $NH \leq 0.9$ criterion. So, 36 groups with different spectral characteristics were created. 15 of the 36 groups that were created had not more than one sample and 3 of them grouped a number of samples (more than 10 samples). In order to achieve representative calibration and validation sets, the most numerous groups were divided into 3 subgroups based on NH ($NH \leq 0.3$, $0.3 \leq NH \leq 0.6$, $0.6 \leq NH \leq 0.9$). One sample from every group or subgroup was allocated in the calibration set. 42 samples were selected to develop a calibration process. In addition, to create the validation set, another sample from every group/subgroup was selected. Only 21 samples were allocated in this set because some groups created had not more than one sample. Fig. 2 shows a graphical description of the sample selection process.

Fig. 3a shows the scores of the wood samples in the space defined by the first and second principal components which described 47.78% (PC1) and 35.40% (PC2) of the spectral variability in the data. PC1 could be used to separate the samples according to the cutting direction of the staves (longitudinal or transversal to the fibers, A, B and C vs D) although this separation would not be complete. If these same samples are represented in the space defined by the first and the third principal components, a slight separation of the samples can be appreciated depending on the staves processed (A, B, C, D) to obtain them (Fig. 3b). Samples belonging to A and B groups have been obtained in the same way, an automatic or manual processing of the staves is the only difference between them, and therefore appear overlapping in this representation. Fig. 3c shows the scores of the calibration and validation samples in the space defined by PC1 and PC2. This space is not entirely the same as the space used to select the calibration and validation sets

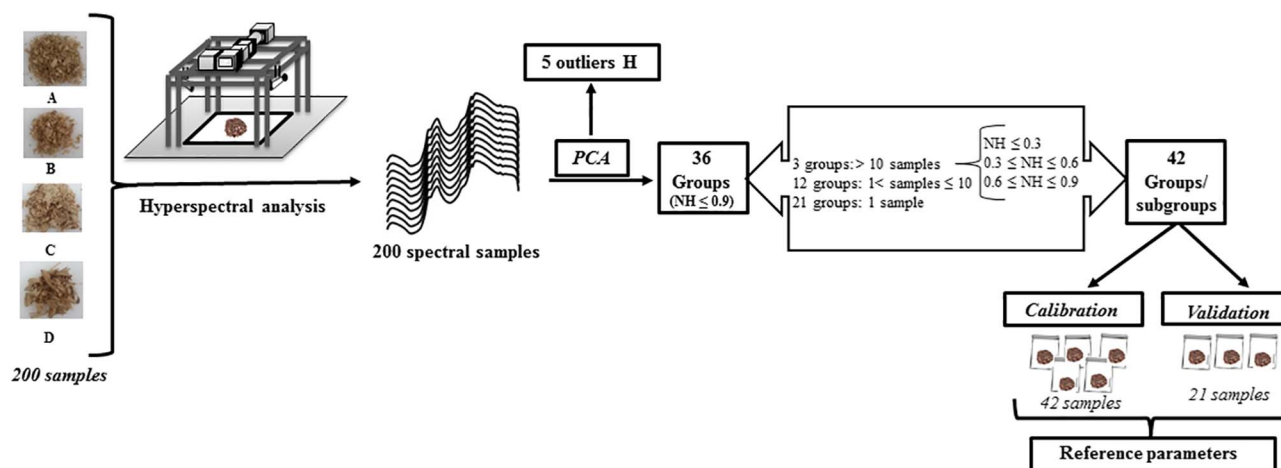


Fig. 2. Graphical description of the sample selection process.

(bearing in mind that 8 PCs were used). However, in this figure, it can be appreciated how both the calibration set and the validation set are homogeneously allocated in the space defined by PC1 and PC2 including almost all the spectral variability of samples and therefore, representing the heterogeneity of the whole set.

3.2. Chemical analysis

Table 1 shows the main statistical descriptors for the reference parameters of the samples allocated in the calibration and validation sets. These statistical indicators show that chemical variability is bigger

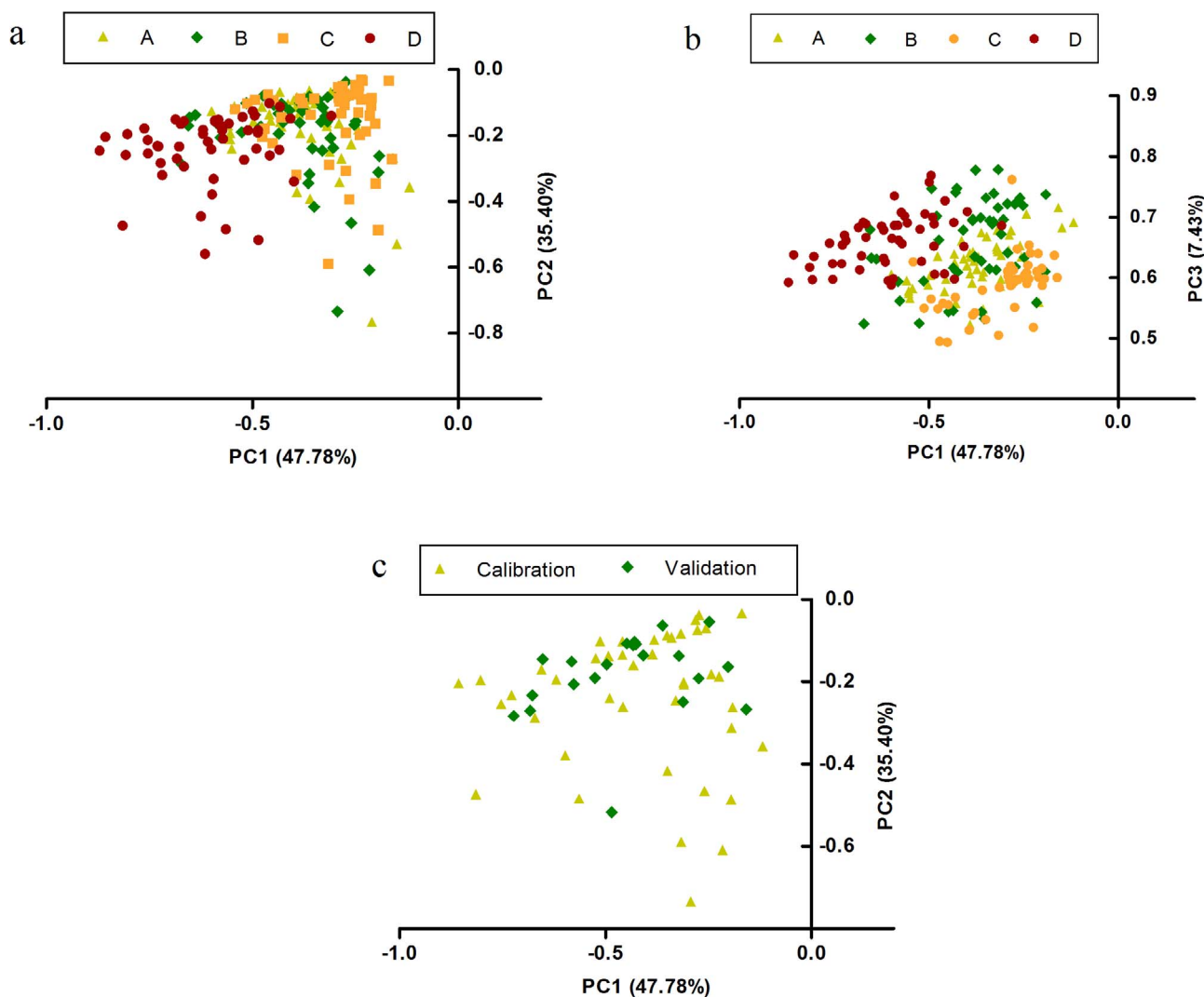


Fig. 3. Score plot of wood samples codified as A, B, C and D samples. (a) In the space defined by PC1 and PC2. (b) In the space defined by PC1 and PC3. (c) Codified as calibration and validation sets in the space defined by PC1 and PC2.

Table 1
Main statistical descriptors for reference parameters in calibration and validation sets.

Set	Reference Parameters	Maximum	Mean	Minimum	SD ^a
Calibration	EPC ^b	69.64	23.80	7.60	16.68
Validation	EPC ^b	46.47	22.20	10.30	12.81

^a SD: Standard deviation.

^b EPC: extractable total phenolic content (mg g⁻¹ of wood, expressed as gallic acid equivalents).

in the calibration set than in the validation one. These results are surely linked with the spectral relationship between both sample sets.

3.3. Calibration process

Quantitative calibrations were developed by modified partial least squares (MPLS) regression and they provided coefficient of determination RSQ = 0.89 and standard error of cross-validation SECV = 5.96 mg g⁻¹ for extractable total phenolic content. As described above, to perform this calibration 42 wood spectra were used as the independent (X) variables. Extractable total phenolic content in wood was used as dependent (Y) variables. The statistical parameters of the final calibration equations are shown in Table 2 where N is the number of samples used to obtain the calibration equation after eliminating samples for chemical reasons (T criterion). The best of the different mathematical treatments, the range of application, and standard deviations are also shown.

The robustness of the selected model was tested using validation set samples, which did not belong to the calibration set, as external validation. Calibration model obtained was applied and the predicted values were compared with the reference data for extractable total phenolic content determined by Folin Ciocalteu method (Fig. 4). The differences between the reference method and the hyperspectral technique in external validation are generally small except in two samples that cause an increase in standard error of prediction (SEP), bearing in mind that without the aforesaid two samples the model could reach an RSQ value around 0.94 and SEP close to 3 mg g⁻¹ of wood in the external validation procedure. However, for the reference parameter, all samples presented reference values within the applicability of the obtained models and none of them is considered as spectral outliers ($H < 3$ for all used samples). So, all samples belonging to validation set must be taken into account in the process. Consequently, RSQ = 0.84 and SEP = 6.31 mg g⁻¹ were obtained as results of this external validation for the reference variable, which also indicates a good potential for a fast screening of extractable total phenolic content using the purposed methodology.

3.3.1. Use of developed method for the screening of extractable polyphenols

The method developed in the preceding section was used to predict the extractable content of total phenols in all of the wood sets. The results show a substantial variability in the reference parameter within

Table 2
Calibration statistical descriptors for the models developed in the NIR zone close to 950–1650 nm.

Spectral pretreatments	Reference Parameters	T outliers	PLS factors	N ^a	Est. Min	SD ^b	Est. Max	SEC ^c	RSQ ^d	SECV ^e	SEP ^f
					(mg g ⁻¹ wood)					(mg g ⁻¹ wood)	
Detrend 1,5,5,1	EPC ^g	4	5	38	0	14.18	65.15	4.72	0.89	5.96	6.31

^a N: number of samples (calibration set).

^b SD: standard deviation.

^c SEC: standard error of calibration.

^d RSQ: coefficient of determination (calibration set).

^e SECV: standard error of cross-validation (7 cross-validation groups).

^f SEP: standard error of prediction (external validation).

^g EPC: extractable total phenolic content (mg g⁻¹ of wood, expressed as gallic acid equivalents).

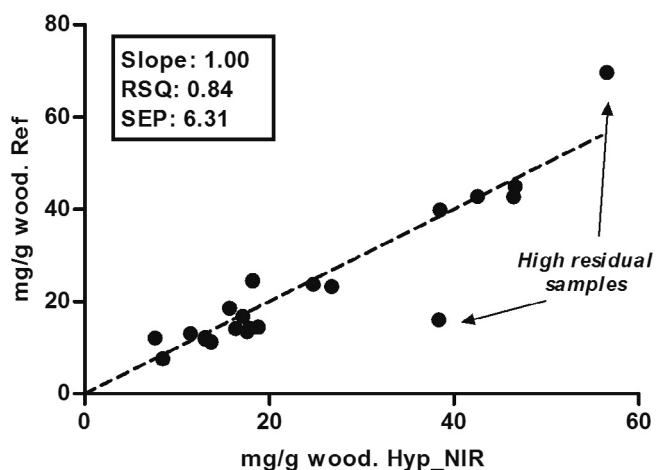


Fig. 4. Comparison of reference values with the values predicted by the hyperspectral imaging model for extractable total phenolic content in samples belonging to the external validation set.

each group of samples. This heterogeneity is noticeable in a similar to approximately Gaussian bell-shaped distribution of samples (Fig. 5). It is noteworthy that extreme values have been also obtained in the analyzed samples and are also presented in the aforesaid plot and taken into account for the statistical descriptors of each group. The extractable content of total phenols is higher in A, B and C groups than D. Samples belonging to the groups A, B and C are generated by different sawing processes of the staves in the longitudinal direction of the fibers while the group D is the result of a processing of the staves in the transversal direction of the fibers. On the basis of the results obtained it can be assumed that these extractable content differences could be due to the structure of the samples.

4. Conclusion

The MPLS model performed presents a good potential for a fast and reasonably inexpensive screening of the extractable polyphenolic compounds in wood coopeage byproduct. This was able to predict the extractable polyphenolic content of a sample based on spectral features. Near infrared hyperspectral imaging arises as an attractive strategy for the feasibility of enhancing the value of coopeage byproduct through the fast determination of extractable bioactive molecules, such as polyphenols. However, a comprehensive study should be made in order to evaluate other factors in the complete development of robust models.

Furthermore, extractable polyphenols content differences between wood samples generated by longitudinal and transversal cutting of the fibers have been also found. It is therefore of interest to establish more information about how wood structure and/ or morphology changes within different levels of phenolic compounds extractability.

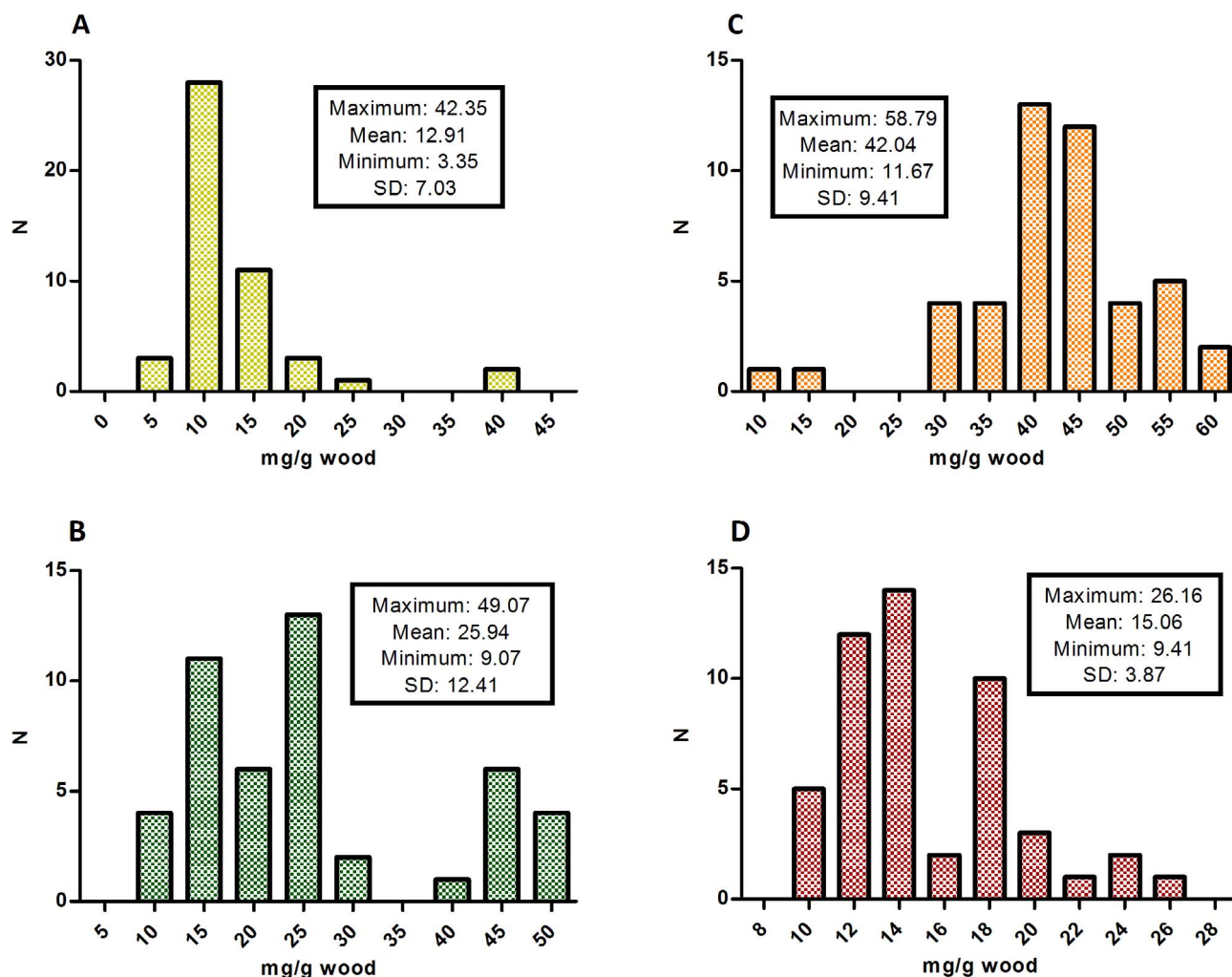


Fig. 5. Distributions of A, B, C and D wood samples in extractable total phenolic content and main statistical descriptors for the predicted values for each group of samples.

Acknowledgments

The Spanish Ministerio de Economía y Competitividad is thanked for project AGL-2014-58486-C2. Universidad de Sevilla is thanked for B. Baca-Bocanegra predoctoral grant (VPPI-II.2) and J. Nogales-Bueno postdoctoral grant (VPPI-II.4). The authors thank the technical staff of Biology Service [Servicios Generales de Investigación (SGI), Universidad de Sevilla]. The authors also thank Tonelería Salas S.L. (Bollullos Par del Condado, Huelva, Spain) for supplying the cooperage byproduct samples.

References

- Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2012). Aromatic potential of *Castanea sativa* Mill. compared to *Quercus* species to be used in cooperage. *Food Chemistry*, *130*(4), 875–881.
- Arapitsas, P., Antonopoulos, A., Stefanou, E., & Dourtoglou, V. G. (2004). Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chemistry*, *86*(4), 563–570.
- Bautista-Ortín, A. B., Lencina, A. G., Cano-López, M., Pardo-Mínguez, F., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). The use of oak chips during the ageing of a red wine in stainless steel tanks or used barrels: effect of the contact time and size of the oak chips on aroma compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *14*(2), 63–70.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wines. A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(67–87).
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester, West Sussex, England: J. Wiley.
- Canals, R., Llaudy, M. D. C., Canals, J. M., & Zamora, F. (2008). Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *European Food Research and Technology*, *226*(5), 1183–1190.
- Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Morgado, B., Jara-Palacios, M. J., Rivas-Gonzalo, J. C., Parrado, J., & Heredia, F. J. (2016). Pre-fermentative addition of an enzymatic grape seed hydrolysate in warm climate winemaking. Effect on the differential colorimetry, copigmentation and polyphenolic profiles. *Food Chemistry*, *209*, 348–357.
- Colares, C. J. G., Pastore, T. C. M., Coradin, V. T. R., Marques, L. F., Moreira, A. C. O., Alexandrino, G. L., ... Braga, J. W. B. (2016). Near infrared hyperspectral imaging and MCR-ALS applied for mapping chemical composition of the wood specie *Swietenia Macrophylla* King (Mahogany) at microscopic level. *Microchemical Journal*, *124*, 356–363.
- Da Silva, A. R., Monteiro Pastore, T. C., Batista Braga, J. W., Davrieux, F., Arakaki Okino, E. Y., Rauber Coradin, V. T., ... do Prado, A. G. S. (2013). Assessment of total phenols and extractives of mahogany wood by near infrared spectroscopy (NIRS). *Holzforchung*, *67*(1), 1–8.
- De Rosso, M., Panighel, A., Vedova, A. D., Stella, L., & Flamini, R. (2009). Changes in chemical composition of a red wine aged in Acacia, Cherry, Chestnut, Mulberry, and Oak Wood Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 1915–1920.
- Del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., & Merino, S. (2008). Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta*, *621*(1), 86–99.
- Del Álamo Sanza, M., & Nevares Domínguez, I. (2006). Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1–2), 255–263.
- Del Álamo Sanza, M., Nevares Domínguez, I., Cárcel Cárcel, L. M., & Navas Gracia, L. (2004). Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Analytica Chimica Acta*, *513*(1), 229–237.
- Dhanoa, M. S., Lister, S. J., & Barnes, R. J. (1995). On the scales associated with near-infrared reflectance difference spectra. *Applied Spectroscopy*, *49*.
- Fernández de Simón, B., Cadahía, E., del Álamo, M., & Nevares, I. (2010). Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them. *Analytica Chimica Acta*, *660*(1–2), 211–220.
- Fernández de Simón, B., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., & Muñoz, A. M. (2014). Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry*, *147*, 346–356.
- Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Martínez, J., Esteruelas, E., & Muñoz, A. M. (2014). Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood. *Food Chemistry*, *143*, 66–76.

- Frangipane, M. T., Santis, D. D., & Ceccarelli, A. (2007). Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chemistry*, *103*(1), 46–54.
- Geladi, P., MacDougall, D., & Martens, H. (1985). Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy*, *39*.
- Giordanengo, T., Charpentier, J. P., Boizot, N., Roussel, S., Roger, J. M., Chaix, G., ... Mourey, N. (2009). OAKSCAN: Procédé de mesure rapide et non destructif des polyphénols du bois de chêne de tonnellerie. *Revue Française d'Oenologie*, *234*, 10–15.
- Glabasnia, A., & Hofmann, T. (2006). Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3380–3390.
- Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Pulido, F. J., Gonzalez-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2013). Application of the differential colorimetry and polyphenolic profile to the evaluation of the chromatic quality of Tempranillo red wines elaborated in warm climate. Influence of the presence of oak wood chips during fermentation. *Food Chemistry*, *141*(3), 2184–2190.
- Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Pulido, F. J., Jara-Palacios, M. J., Ramírez-Pérez, P., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Impact of adding white pomace to red grapes on the phenolic composition and color stability of Syrah wines from a warm climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(12), 2663–2671.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Mateus, N., Escudero-Gilete, M. L., Gonzalez-Miret, M. L., Heredia, F. J., & de Freitas, V. (2012). Application of LC-MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region. *Analytica Chimica Acta*, *732*, 162–171.
- Guchu, E., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., González-Viñas, M. A., & Ibáñez, M. D. C. (2006). Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chips. *Food Chemistry*, *99*(2), 350–359.
- Hernández-Hierro, J. M., Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F. J., & Heredia, F. J. (2013). Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(41), 9804–9809.
- Jones, P. D., Schimleck, L. R., Peter, G. F., Daniels, R. F., & Clark, A. (2006). Nondestructive estimation of wood chemical composition of sections of radial wood strips by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. *Wood Science and Technology*, *40*(8), 709–720.
- Lestander, T., Geladi, P., Larsson, S., & Thyrel, M. (2012). Near infrared image analysis for online identification and separation of wood chips with elevated levels of extractives. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *20*, 591–599.
- Michel, J., Albertin, W., Jourdes, M., Le Floch, A., Giordanengo, T., Mourey, N., & Teissedre, P.-L. (2016). Variations in oxygen and ellagitannins, and organoleptic properties of red wine aged in French oak barrels classified by a near infrared system. *Food Chemistry*, *204*, 381–390.
- Michel, J., Jourdes, M., Le Floch, A., Giordanengo, T., Mourey, N., & Teissedre, P.-L. (2013). Influence of wood barrels classified by NIRS on the Ellagitannin content/composition and on the organoleptic properties of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(46), 11109–11118.
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, *43*(7), 1844–1855.
- Mori, K., Sugaya, S., & Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*, *105*(3), 319–330.
- Navarro, M., Kontoudakis, N., Giordanengo, T., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Fort, F., ... Zamora, F. (2016). Oxygen consumption by oak chips in a model wine solution; Influence of the botanical origin, toast level and ellagitannin content. *Food Chemistry*, *199*, 822–827.
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Heredia, F. J., & Hernández-Hierro, J. M. (2015). Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins. *Food Chemistry*, *172*, 559–564.
- Nogales-Bueno, J., Hernández-Hierro, J. M., Rodríguez-Pulido, F. J., & Heredia, F. J. (2014). Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach. *Food Chemistry*, *152*, 586–591.
- Pedroza, M. A., Carmona, M., Alonso, G. L., Salinas, M. R., & Zalacain, A. (2013). Pre-bottling use of dehydrated waste grape skins to improve colour, phenolic and aroma composition of red wines. *Food Chemistry*, *136*(1), 224–236.
- Puech, J. L., Feuillat, F., & Mosedale, J. R. (1999). The tannins of oak heartwood: Structure, properties, and their influence on wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*(4), 469–478.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of enology*, Vol. 2. Baffins Lane, Chichester: John Wiley.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Ortega-Heras, M., Pérez-Magarino, S., & González-Huerta, C. (2009). Volatile compounds of red wines macerated with Spanish, American, and French oak chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(14), 6383–6391.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995). *Routine operation, calibration, development and network system management manual, NIR systems*. MD, USA: Silver Spring.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.
- Sun, B., Liu, J., Liu, S., & Yang, Q. (2011). Application of FT-NIR-DR and FT-IR-ATR spectroscopy to estimate the chemical composition of bamboo (*Neosinocalamus affinis* Keng). *Holzforchung*, *65*(5).
- Thumm, A., Riddell, M., Nanayakkara, B., Harrington, J., & Meder, R. (2010). Near infrared hyperspectral imaging applied to mapping chemical composition in wood samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *18*(6), 507–515.
- Yao, S., Wu, G. F., Jiang, Y. F., Fu, X. D., Lü, H. K., Su, M., & Pu, J. W. (2010). Extending hemicelluloses content calibration of *Acacia* spp. using NIR to new sites. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis*, *30*(5), 1206–1209.
- Zahri, S., Moubarik, A., Charrier, F., Chaix, G., Bailleres, H., Nepveu, G., & Charrier, B. (2008). Quantitative assessment of total phenol contents of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) by diffuse reflectance NIR spectroscopy on solid wood surfaces. *Holzforchung*, *62*(6), 679–687.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Madrid: Mundi Prensa.

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE VIABILIDAD DEL USO DE UN DISPOSITIVO PORTÁTIL DE ESPECTROSCOPIA NIR PARA LA ESTIMACIÓN “IN SITU” DEL CONTENIDO POLIFENÓLICO EXTRAÍBLE EN HOLLEJOS DE UVA TINTA

En: Baca Bocanegra, Berta; Hernández Hierro, José Miguel; Nogales Bueno, Julio; Heredia Mira, Francisco José: *Feasibility study on the use of a portable micro near infrared spectroscopy device for the “in vineyard” screening of extractable polyphenols in red grape skins*. Talanta, 2019. Vol. 192. Pág. 353–359, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.057>

1. Antecedentes

Los compuestos fenólicos juegan importantes y variados papeles en el reino vegetal. En la uva, los flavanoles participan en las características sensoriales del vino, pudiendo aportar amargor, astringencia o cuerpo (Hufnagel, et al., 2008a), así como aumentan y estabilizan el color actuando como cofactores del proceso de copigmentación de los antocianos (Escribano-Bailon, et al., 2012; Trouillas, et al., 2016). Un déficit de compuestos fenólicos en el hollejo de uva en el momento de la vendimia deriva en la producción de vinos con poca intensidad y estabilidad cromática (Gordillo, et al., 2012). Por tanto, para el proceso de vinificación es de extrema importancia conocer la cantidad de compuestos fenólicos que puede esperarse obtener a partir de una determinada cosecha de uva.

Como se ha visto en capítulos anteriores las técnicas de espectroscopía vibracional representan un procedimiento analítico de gran utilidad en la industria como técnica rápida, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente. Los diferentes campos de aplicación de estas técnicas demuestran su enorme versatilidad. En el sector agroalimentario en general y enológico en particular, la aplicación de la espectroscopía infrarroja es bien conocida y su uso extendido (Kumaravelu, Gopal, y Ieee, 2015). Sin embargo, a pesar de la efectividad y rapidez de estas técnicas para predecir diferentes parámetros en el sector del vino, la mayoría de los estudios deben ser llevados a cabo en el laboratorio y, por tanto, implican el transporte de muestras con los inconvenientes que ello conlleva. Para resolver este problema, en los últimos años el interés se ha desplazado hacia el desarrollo de una nueva generación de espectrómetros portátiles (Teixeira dos Santos, Lopo, Pascoa, y Lopes, 2013). Estos sistemas incorporan la precisión analítica necesaria para la identificación y cuantificación química con una resolución espectral equivalente a los instrumentos de mesa, lo que proporciona una mayor flexibilidad para el análisis en campo ya que el equipo puede transportarse fácilmente (Sorak, et al., 2012).

Disponer de modelos aplicables en el viñedo para la determinación del contenido fenólico extraíble de las uvas permitirá un mayor control y eficacia en la toma de decisiones, como la fecha idónea de vendimia, por lo que se considera de gran interés el estudio de su viabilidad..

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la viabilidad del uso de un dispositivo portátil de espectroscopía de infrarrojo cercano, MicroNIRTM, para la estimación *in situ* del contenido extraíbles de antocianos, flavanoles y fenoles totales en hollejo de uva tinta apta para vendimia, utilizando dos metodologías de medida distintas en dos campañas diferentes.

3. Parte Experimental

Para la realización de este estudio se utilizaron muestras de uva tinta de las variedades Syrah y Tempranillo cultivadas en la región del Condado de Huelva. Con el objetivo de optimizar el proceso de adquisición de espectros, se diseñó un experimento dividido en dos campañas sucesivas (2016 y 2017) pero, en ambos casos, considerando un estado fisiológico concreto de la uva: uvas maduras justo antes de la vendimia. En ambos años, el análisis espectroscópico se llevó a cabo en el viñedo, pero se realizó una modificación de las condiciones de medida.

- En la campaña 2016, la adquisición de los espectros de las uvas fue realizada directamente en la vid, sin preparación alguna de la muestra. Las uvas cuyos espectros fueron registrados, se recolectaron para su análisis químico, a fin de obtener valores de referencia para las propiedades evaluadas.
- En la campaña 2017, el análisis espectral se realizó sobre el hollejo. Para ello, las uvas seleccionadas se extrajeron del racimo e inmediatamente después los hollejos fueron separados manualmente del resto de la baya para someterlas al análisis espectral. Las muestras se colocaron adecuadamente en cubetas de vidrio para poder registrar el espectro de la superficie externa del hollejo, presionando suavemente dentro de la cubeta para aumentar la superficie de contacto.

Con el objetivo de lograr conjuntos representativos de muestras, las uvas se seleccionaron de la parte superior, media e inferior del racimo y de las zonas de sol y de sombra de las vides, ubicadas en diferentes filas dentro del viñedo. Se registró un total de doscientos espectros en cada temporada, cien espectros de variedad Tempranillo y cien espectros de variedad Syrah.

Una vez registrado el espectro, las muestras (uvas enteras en 2016 y hollejos de uva en 2017) fueron colocadas en bolsas de plástico herméticas, etiquetadas, congeladas y almacenadas

a -20 °C hasta que se realizaron los análisis químicos. Antes de estos análisis, los hollejos de uva pertenecientes a la cosecha 2016 fueron separados manualmente de las uvas enteras.

La adquisición espectral se realizó utilizando un espectrofotómetro NIR portátil (MicroNIR Pro Lite 1700) que cubre el rango espectral entre 908 y 1676 nm. Para cada medida se realizó una calibración de reflectancia de dos puntos utilizando un patrón de referencia Labsphere® como referencia blanca (100% de reflectancia), mientras que la corriente oscura (0% de reflectancia) se registró al aire, colocando el dispositivo a aproximadamente 0.5 metros de cualquier objeto. Para la adquisición espectral se utilizó un dispositivo que protege la medida de la acción directa del sol.

En cada temporada, la matriz espectral original fue sometida a un análisis de componentes principales que permitió realizar una selección de muestras representativas del conjunto. Utilizando todas las muestras espectrales y el pretratamiento SNV 2,5,5,1, se tuvieron en cuenta tres y cinco componentes principales en la temporada 2016 y 2017, respectivamente. En ambos casos se explicó más del noventa y cinco por ciento de la variabilidad espectral de la matriz espectral original. Se encontraron diez y ocho *outliers* espectrales ($H > 3$) respectivamente, que se eliminaron de cada matriz espectral. Las muestras restantes fueron ordenadas en los nuevos espacios creados de acuerdo a su distancia de Mahalanobis (H) y se agruparon en función de la distancia de Mahalanobis a la muestra vecina (NH) obteniéndose 32 y 23 grupos de muestras para las campañas 2016 y 2017 respectivamente. Se asignó una muestra de cada grupo en el conjunto de calibración y otra en el de validación. Para la campaña 2016, el conjunto de calibración estaba formado por 32 muestras mientras que solo se asignaron 27 muestras en el conjunto de validación porque algunos de los grupos creados no tenían más de una muestra. Siguiendo el mismo procedimiento para la campaña 2017, 23 y 18 muestras constituyeron el conjunto de calibración y validación, respectivamente.

Se determinó el contenido extraíble de antocianos, flavanoles y fenoles totales en hollejo de uva para las muestras alojadas en el set de calibración y validación de cada campaña. Para ello, los hollejos fueron macerados durante tres días en vino sintético y se determinaron las concentraciones de los parámetros de interés en los extractos resultantes. La determinación de antocianos se realizó mediante análisis cromatográfico, siguiendo una modificación del método descrito por M. García-Marino, et al. (2010) como se describe en Hernández-Hierro, et al. (2013). Para la determinación de flavanoles se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Vivas, et al. (1994) mientras que la determinación de los fenoles totales presentes en los extractos se utilizó el también método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton, et al., 1965).

Para cada temporada y cada parámetro de referencia, utilizando los datos espectrales de los conjuntos de calibración, probando diferentes pretratamientos espectrales y asignando los

contenidos fenólicos extraíbles, contenidos flavanólicos extraíbles y contenidos antociánicos extraíbles correspondientes a cada muestra, se desarrolló un modelo de calibración mediante regresión de mínimos cuadrados modificados (MPLS) y se realizó la validación externa del modelo usando las muestras alojadas en los conjuntos de validación.

Comparativamente, los errores obtenidos son mayores que los de un estudio anterior, realizado en nuestro laboratorio, utilizando la misma matriz y una metodología similar en cuanto a región del espectro electromagnético, detector y análisis quimiométrico (Nogales-Bueno, et al., 2015). La principal novedad de este estudio es la adquisición espectral *in situ*, en el viñedo, que puede verse influenciada por factores climáticos que deberán ser considerados en estudios posteriores.

Por último, para cada temporada y cada parámetro de referencia, las muestras de los conjuntos de calibración y validación se dividieron en dos clases en función de su contenido extraíble. De esta forma, las muestras se identificaron como muestras con bajo o alto contenido fenólico extraíble, contenido flavanólico extraíble o contenido antociánico extraíble. Estas nuevas variables categóricas se usaron junto con los datos espectrales para el desarrollo de diferentes modelos cualitativos (análisis discriminante lineal (LDA), análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales (DPLS) y coeficiente de correlación de Pearson) con el objetivo de discriminar las muestras en las nuevas clases creadas y evaluar dicha discriminación en validación interna y externa. Los porcentajes de muestras clasificadas correctamente en validación interna y externa para cada parámetro de referencia y temporada se muestran en la

De forma similar a lo que sucede con los resultados cuantitativos, los diferentes enfoques llevados a cabo para la discriminación de muestras de acuerdo con su nivel de compuestos extraíbles muestran resultados insuficientes. Únicamente las validaciones internas en la temporada 2017 muestran porcentajes de clasificación aceptables, especialmente para LDA. Sin embargo, estos resultados no son consistentes en el procedimiento de validación externa y los porcentajes de muestras correctamente clasificadas caen incluso más que en la temporada 2016.

4. Conclusiones

- Los modelos cuantitativos MPLS desarrollados a partir del análisis espectral *in situ* en el infrarrojo cercano no presentan el potencial suficiente para estimar el contenido extraíble de compuestos fenólicos (flavanoles, antocianos y fenoles totales) procedentes de uva tinta a pesar de que se han obtenido resultados prometedores en nuestro laboratorio para otras matrices, como se mostrará en el siguiente Capítulo de esta memoria, y para la misma matriz usando una metodología similar.

- .El análisis cualitativo de los datos (LDA, DPLS y coeficiente de correlación de Pearson) ofrece porcentajes de clasificación correcta de las muestras que comprometen la utilidad de la espectroscopía NIR portátil para la clasificación de uva tinta según el nivel de contenido fenólico extraíble.
- Se deben considerar las condiciones ambientales y las condiciones fisiológicas de la uva para evaluar y eliminar los factores que dificultan una buena clasificación de las bayas de acuerdo con sus contenidos fenólicos extraíbles.



Feasibility study on the use of a portable micro near infrared spectroscopy device for the “*in vineyard*” screening of extractable polyphenols in red grape skins

Berta Baca-Bocanegra, José Miguel Hernández-Hierro, Julio Nogales-Bueno*, Francisco José Heredia

Food Colour and Quality Laboratory, Á. Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Extractable polyphenols
Red grapes
Portable spectroscopy
NIR
Chemometrics
Wine

ABSTRACT

There is substantial variation in levels of extractable phenolic compounds of red grapes (*Vitis vinifera* L.). Therefore, it could be desirable to know the aforesaid parameter at least for each vine. Nowadays, interest has shifted toward the development of portable vis/NIR systems, innovation in optical system design and miniaturization for its friendly use directly in the field.

Spectra of intact grapes and grapes skins were recorded at harvest time in two different vintages (2016 and 2017 respectively) using a portable micro NIR spectrophotometer (908–1676 nm). A number of chemometric approaches have been used for spectral interrogation and evaluation of the aforesaid device. Spectral data have been correlated with red grape skin extractable polyphenols (total phenolic, anthocyanins and flavanols) by modified partial least squares regression (MPLS) using a number of spectral pretreatments. Moreover, different statistics strategies have been performed to develop a qualitative analysis of the data (linear discriminant analysis, discriminant partial least square analyses and Pearson's similarity index).

After an exhaustive analysis of the obtained results in two different seasons, it can be concluded that the use of the portable micro NIR device for the “*in vineyard*” screening of extractable polyphenols in red grape skins is hampered by a number of factors. Environmental and physiological conditions should be considered to evaluate and remove factors that hamper a good sorting the berries according to their extractable polyphenol contents.

1. Introduction

Red grapes (*Vitis vinifera* L.) contain about four grams of phenolic material per kilo. These compounds are secondary metabolites that play crucial roles in the plant kingdom. There are substantial variations in levels of phenolic compounds which depends on a number of physiologic, agronomic or climatological factors [1,2]. Wine and grape phenolic compounds are grouped into two categories, flavonoids and non-flavonoids. Wine flavonoids are all polyphenolic compounds, having multiple aromatic rings presenting hydroxyl groups [3]. Flavonoids have well-known health benefits. They possess ideal structural chemistry for free radical-scavenging activities, and they have been shown to be more effective antioxidants in vitro than vitamins E and C on a molar basis [4].

Most flavonoids in red grapes are found in berry solid parts and they are transferred to the wine during the fermentation process. Wine flavonoids (mainly flavonols, flavanols and anthocyanins) play a relevant role in the sensory characteristic of red wines. They are directly or indirectly responsible for wine color [3,5,6] and have a strong influence in wine taste (astringency, sourness, bitterness, etc.) [7].

Taking into account these aspects, it could be desirable to know the amount of these phenols that may be extracted from grapes to wine, at least for each vine. The conventional chemical methods used for determination of these parameters are destructive and time consuming because they require the extractions of different phenols from grape skin using wine simulated macerations [8–10]. Near infrared (NIR) spectroscopy has been widely used in the oenological field for grape and wine

Abbreviations: NIR, near infrared; MPLS, modified partial least squares; LVF, linear variable filter; PLS, partial least squares; DPLS, discriminant partial least square; LDA, linear discriminant analysis; EPC, extractable total phenolic content; EFC, extractable flavanol content; EAC, extractable anthocyanin content; DMACA, 4-dimethylaminocinnamaldehyde; DAD, diode array detector; PCA, principal component analysis; H, Mahalanobis distance; NH, neighborhood Mahalanobis distance; ROC, receiver operating characteristic; SEP, standard error of prediction

* Corresponding author.

E-mail address: julionogales@us.es (J. Nogales-Bueno).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.057>

Received 19 July 2018; Received in revised form 12 September 2018; Accepted 17 September 2018

Available online 20 September 2018

0039-9140/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

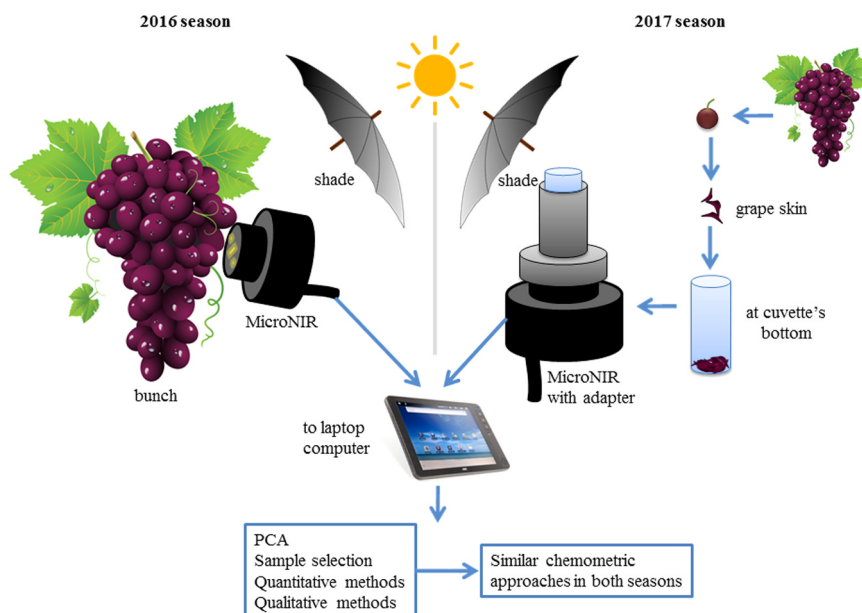


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design.

analysis [11]. This technique has shown considerable potential for the nondestructive determination of the main families of phenolic compounds in grapes [12,13]. The use of NIR spectroscopy to predict total soluble solids, pH, and total anthocyanins in red grapes [14,15] and other technological parameters useful for classifying grapes [16] have been also reported. In a further step, near infrared hyperspectral imaging has been used to develop screening methods to measure total or extractable phenols in grapes [17,18]. This methodology may allow sorting the berries according to their extractable polyphenol contents and then the same samples could be used in further studies for other destructive analyses or purposes. However, despite the fast and effective proficiency of near-infrared spectroscopy to predict different parameters in wine sector, most of these studies carried out at lab imply sample transportation. To solve this problem portable hand-held NIR spectrometers have been recently used to acquire NIR spectra in vineyards, directly on-the-vine [19–22]. However, it should be taken into account that these portable systems are composed of different elements such lightening system, batteries and fiber optic probe in addition to the portable spectrophotometer that may difficult their used in field conditions. In a further step, interest has shifted toward the development of portable vis/NIR systems using Linear Variable Filter (LVF), innovation in optical system design and miniaturization due to the fact that it does not need any external components because all the needed parts are incorporated into its design. Although limited information is still available with regards to this technology on the enology sector, their use could be significantly hindered by the varying conditions of field measurements.

A huge amount of information generated by all these spectroscopic devices has to be correctly processed to obtain useful information. Quantitative or qualitative chemometric tools are usually applied for the development of calibration or classification methods. Partial least square (PLS) regression has been widely used for the development of calibration methods for the prediction of different parameters in grapes [23]. Moreover, supervised pattern recognition methods, such as discriminant partial least square (DPLS) analysis or linear discriminant analysis (LDA), are usually applied to the identification of spatial regions of interest in oenological samples [24,25] or to the classification of grape samples according to some important attribute [26–29].

The main aim of this work is to study the feasibility of the use of a portable micro near infrared spectroscopy device for the “in vineyard” screening of extractable polyphenols in red grape skins. The aforesaid new device does not need any external probes, fiber optics or external

illumination sources because all the needed parts are incorporated into its miniaturized design. Grape skin spectra have been collected in two different seasons using two different measurement methodologies to obtain the spectral data. A number of samples spectrally representative have been selected and the extractable contents of total phenols, flavanols and anthocyanins have been chemically evaluated. Finally, different chemometric quantitative and qualitative tools have been interrogated to obtain the best approach for the spectral screening of these extractable contents in grape skin. To the best of our knowledge, this is also the first time that the aforementioned parameters have been jointly evaluated using a portable device.

2. Material and methods

2.1. Samples

Vitis vinifera L. cv. Tempranillo and Syrah red grapes samples from two vineyards located in the Condado de Huelva Designation of Origin D.O. (Andalusia, Spain) were used in the present study. Both varieties are typically grown in Spain for producing quality red wines and being a resistant cultivar to warm climatic conditions [30].

In an attempt to optimize the spectra acquisition procedure, it was designed a systematic experiment which was divided into two seasons as shown in the Fig. 1. To face this task, grapes were collected in two different vintages (2016 and 2017) at harvest time. In both years NIR spectroscopy analysis was carried out “in vineyard” but a modification of measurement conditions was performed.

- In 2016 season grape spectra were collected directly on the bunch, without any sample preparation. Samples whose spectra were recorded were then collected for chemical analysis, to provide reference values for the measured properties.
- In 2017 season the engaging grapes were picked from the bunch and just after that grape skins were manually separated from the whole grapes and placed at the bottom of quartz cuvettes to collect the spectra. Samples were soft-pressed inside the cuvette to increase the contact surface. Spectra were recorded from the external surfaces of the skins.

With the aim of achieving representative sample sets, the grapes were selected from the top, middle and bottom of the bunch and in the

sunlight and shade side of vines located in different rows within the vineyard. Edge rows and the first two vines in a row were avoided. A total of 200 spectra were collected in each season, 100 Tempranillo spectra and 100 Syrah spectra.

Once the spectrum was registered, the samples (whole grapes from 2016 and grapes skins from 2017) were placed in stoppered plastics bags, labelled, refrigerated at 4 °C and immediately carried to the laboratory. Therefore, in this study, a total of 400 grape samples have been taken into account (200 samples in 2016 and 200 samples in 2017, i.e. 100 samples per variety and season). Upon arrival at the lab, grapes were frozen and stored at – 20 °C until analyses were performed. Prior to each chemical measurement, grape skins belonging to vintage 2016 were separated manually from the whole grapes and they were weighted. All samples were allowed to stabilize at laboratory temperature (25 °C) before the chemical analysis.

2.2. Spectral data acquisition

In-situ acquisition of spectra was performed using a portable NIR spectrophotometer (MicroNIR Pro Lite 1700, VIAVI, Santa Rosa, California, USA), an instrument designed to measure diffuse reflectance in the NIR region of the electromagnetic spectrum. The MicroNIR owes its small size to the novel thin-film linearly variable filter (LVF) used as the dispersive element. The LVF is directly coupled to a linear detector array (128-pixel uncooled InGaAs photodiode array), covering the spectral range between 908 and 1676 nm (spectral resolution of 6.2 nm). The filter coating in the LVF is wedged in one direction and as a result of the varying film thickness; the wavelength transmitted through the filter varies linearly in the direction of the wedge. The LVF makes each pixel of the detector respond to a different wavelength. This ultra-compact spectroscopic engine is coupled with a tungsten lamps diffuse illumination system. An illustration of the MicroNIR spectrometer and MicroNIR's optical designed, adapted from VIAVI user manual, is provided in Fig. S1.

Spectra were recorded using the instrument acquisition software MicroNIR™ Pro v.2.2 (VIAVI, Santa Rosa, California, USA). A two-point reflectance calibration was used. A Spectralon® ceramic tile was used as a white reference (100% reflectance), whereas dark current (0% reflectance) was recorded by taking a measurement placing the device about 0.5 m from any object. Because measurements were made on the vineyard, sample temperature was not controlled beforehand; mean temperature on measurement days ranged from 30 to 35 °C, typical extreme temperature of warm climates in August and September. Spectral acquisition was performed in shade using a light-tight box.

2.3. Reference parameters

Reference parameters taken into account were extractable total phenolic content, extractable flavanol content and extractable anthocyanin content in grape skin (EPC, EFC and EAC respectively). To perform these determinations, grape skins were immersed in a model wine hydroalcoholic solution (4 g L⁻¹ tartaric acid, 12.5% ethanol, adjusted at pH 3.6 with NaOH 0.5 M) for a maceration period of 72 h. Grape skins were added to extraction media in a 1:20 ratio. Then, supernatants were used into the subsequent analyses.

Extractable total phenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu method [31]. Gallic acid was used as a standard for construction of the calibration curve and the concentration of total phenols was expressed as gallic acid equivalent in mg g⁻¹ of grape skin.

Extractable flavanol content was determined following a modification of Vivas et al. [32]. Twenty microliters of model wine extractions were mixed with 180 µL of methanol respectively and 1 mL of DMACA reagent. The DMACA (4-dimethylaminocinnamaldehyde) reagent was prepared immediately before use, containing 0.1% (w/v) DMACA in a mixture of HCl:methanol (1:10, v/v). After a ten-minute period, the absorbance at 640 nm was measured for each sample. A calibration

curve of (+)-catechin was used for quantification and results were expressed as (+)-catechin equivalent in mg g⁻¹ of grape skin.

Both Folin–Ciocalteu and DMACA analyses were performed on an Agilent 8453 UV–visible spectrophotometer (Palo Alto, USA), equipped with diode array detection (DAD). The extract volumes were appropriately modified for samples which needed it.

Extractable anthocyanin content was determined by means of chromatographic analysis following a modification of the method of García-Marino et al. [33] as described elsewhere in Hernández-Hierro et al. [17]. Model wine extractions were diluted 1:2 with 0.1 M HCl, filtered through 0.45 µm pore size filters and directly injected into the chromatographic system. Results were expressed as mg of malvidin-3-O-glucoside equivalents per gram of grape skin.

2.4. Chemometric analysis

2.4.1. Quantitative analysis

Before the quantitative analysis, principal component analysis (PCA) was used as unsupervised pattern recognition technique to get information about the latent structure of spectral matrix. This method provides not only information related to spectral outliers and the distribution of samples in the newly-created space, but it is also an important source of knowledge with which to create cross-validation groups used in the calibration process [34,35]. PCA was also used to select representative samples from the spectral data set. Mahalanobis distances (H) for each sample were calculated and samples were grouped according their neighborhood H values (NH).

For each season, using the raw spectral data, testing different spectral pretreatments and allocating the corresponding EPC, EFC and EAC to each sample, calibrations were performed by modified partial least squares regression (MPLS). In this method, the group of calibration samples is divided into a series of subsets to perform cross-validation to set the number of PLS factors, reduce the possibility of overfitting [35] and remove chemical outliers. Using the $T \geq 2.5$ criterion, samples that presented a high residual value when they were predicted were eliminated from the set.

The software used was Win ISI® (v1.50) (Infrasoft International, LLC, Port. Matilda, PA, USA). This software allowed the data pretreatment, principal components analysis and sample selection and development of quantitative models.

2.4.2. Qualitative approaches

For each reference parameter, grape samples allocated into the calibration and validation sets were respectively split in two different classes according to their extractable content. The statistical median value of each reference parameter in the calibration set was used to develop these classifications. In this way, samples were identified as samples with low or high EPC, EFC or EAC. These new categorical variables were used in conjunction with spectral data for the development of different qualitative chemometric methods. These methods usually indicate whether samples fall into pre-defined classes, how well, and what causes this separation.

Qualitative analyses were carried out for each reference parameter and season. Linear discriminant analysis (LDA) and discriminant partial least square analysis (DPLS) were applied to the spectral matrixes in order to develop different classification methods. The objective of developing these methods is to obtain fast tools for the classification of grape samples according their extractable contents of phenolic compounds (EPC, EFC or EAC). LDA was carried out via SPSS 22.0 for Windows software package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Prior probabilities of classification were used in this analysis taking into account each class size. The prediction ability was estimated considering the percentage of samples correctly classified by the rules developed with the training set using an internal validation procedure and the external validation set available. The variables used were all the scores of the PCs used in the sample selection for each season.

Table 1

Main statistical descriptors for the MPLS models developed in the NIR zone close to 908–1676 nm in 2016 and 2017 seasons.

Season	Spectral pretreatments	Reference parameters	T outliers	PLS factors	N ^a	Est. Min	SD ^b	Est. Max	SEC ^c	RSQ ^d	SECV ^e	SEP ^f
2016	None 2,7,7,1	EPC ^g	1	2	31	0.39	1.82	11.29	1.62	0.20	1.72	2.66
	MSC 2,5,5,1	EFC ^h	1	2	31	0.00	0.50	2.57	0.42	0.32	0.49	0.60
	Detrend 2,13,13,1	EAC ⁱ	2	4	30	0.00	0.47	2.15	0.33	0.49	0.43	0.43
2017	Detrend 1,5,5,1	EPC ^g	0	2	23	0.00	3.45	18.71	3.04	0.22	3.41	4.04
	MSC 2,5,5,1	EFC ^h	0	5	23	0.00	0.51	2.66	0.28	0.70	0.44	0.64
	SNV 0,0,1,1	EAC ⁱ	0	2	23	0.00	0.44	2.48	0.34	0.42	0.36	0.60

^a N: number of samples (calibration set).^b SD: standard deviation.^c SEC: standard error of calibration.^d RSQ: coefficient of determination (calibration set).^e SECV: standard error of cross-validation (2016: 7 cross-validation groups; 2017: 8 cross-validation groups).^f SEP: standard error of prediction (external validation).^g EPC: extractable total phenolic content (mg g⁻¹ of grape skin, expressed as gallic acid equivalents).^h EFC: extractable flavanol content (mg g⁻¹ of grape skin, expressed as catechin equivalents).ⁱ EAC: extractable anthocyanin content (mg g⁻¹ of grape skin, expressed as gallic acid equivalents).

Moreover, DPLS were also carried out. Essentially, a PLS method attempts to concentrate the relevant information contained in the variables measured in a lower number of variables without losing of relevant information. Regression is carried out with these new variables, simplifying the calibration model and interpretation of the results. Win ISI[®] (v1.50) (Infrasoft International, LLC, Port. Matilda, PA, USA) was used for carried out DPLS analyses and they were performed using, as independent variables (X), grape skin spectra allocated into the calibration sets. In addition, developed models were tested with spectra allocated into the validation sets and the percentages of samples correctly classified in external validation were obtained.

Pearson's similarity index was also applied to discriminate spectral samples according to their extractable contents. Average spectra of samples allocated into the calibration set with low or high extractable content were respectively obtained. Next, a Pearson's linear regression was performed between each spectral sample and the average spectrum of low extractable content class and the same procedure was repeated for the high class. Following, the Pearson's similarity indexes were calculated as:

$$\text{Similarity index} = \frac{1}{1-R^2}$$

Indexes were compared and samples were classified according this procedure in the group that has obtained the higher index (i.e. low or high extractable content), obtaining the percentages of samples correctly classified in internal validation. Last, validation set was used to obtain the percentages of samples correctly classified in external validation. This procedure was repeated for each reference parameter (EPC, EFC and EAC) and for each season and it was carried out via Win ISI[®] (v1.50) (Infrasoft International, LLC, Port. Matilda, PA, USA).

Finally, percentages of samples correctly classified obtained in each qualitative chemometric analysis were jointly plotted in ROC curves via SPSS 22.0 for Windows software package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Sample selection

Sample selection was made to reduce the number of samples maintaining as much spectral variety as possible as described elsewhere in Nogales-Bueno et al. [18]. The selection was carried out from a PCA. Using all spectral samples and SNV 2,5,5,1 pretreatment, three and five principal components were taken into account in 2016 and 2017 season respectively. More than ninety five per cent of the spectral variability of original spectral matrix was explained in both cases. Ten and eight spectral outliers (H > 3) were found respectively and removed from

each spectral matrix respectively. In these new three-dimensional and penta-dimensional spaces created, the samples were grouped according their neighborhood H values (NH). One sample from every group was allocated in the calibration set. In addition, to create the validation set, another sample from every group was selected. So, 32 samples were selected to develop a calibration process in 2016 season. Only 27 samples were allocated in the validation set because some groups created had not more than one sample. Following a similar procedure in 2017, 23 and 18 samples formed the calibration and validation set respectively.

3.2. Quantitative calibrations

Quantitative calibrations were developed by modified partial least squares (MPLS) regression. These calibrations were performed using, as independent variables (X) the grape skin spectra allocated into the calibration sets (i.e., 32 and 23 spectral samples for 2016 and 2017 seasons respectively). Reference parameters (EPC, EFC and EAC) previously determined for grape skin samples in each season were used as dependent variables (Y). The statistical parameters of the final calibration equations are shown in Table 1 where N is the number of samples used to obtain the calibration equation after removing samples for chemical reasons (T criterion). The mathematical treatment applied (i.e., the best of the different tried treatment), the range of application, and standard deviations are also shown for each reference parameter.

External validations were carried out for each selected model. In 2016, two samples presented reference values outside of the applicability range of the obtained model in the case of EAC. In 2017, one sample presented reference values outside of the applicability range of the obtained models in the cases of EPC and EAC. These samples were removed from their respective validation sets and the validation procedures were carried out taking into account only samples which presented reference values within the applicability range of the obtained models. As result of the external validation, the standard errors of prediction (SEP) were obtained for each reference variable, these values were also included in Table 1.

Comparatively, these errors are higher than those obtained in our previous study developed using a bench top instrument [36] but in accordance with the high errors previously obtained by Guidetti et al. [20] for the estimation of extractable anthocyanins and polyphenols in grapes using a portable device. With regard to the aforesaid bench top study, near infrared hyperspectral imaging, with a similar InGaAs sensor, was used for the prediction of the same reference parameters. Hyperspectral imaging was applied to similar samples than ones used in the present study, that is, Syrah and Tempranillo grapes collected in the same region at harvest time and the whole grapes were used for the

Table 2

Percentages of samples correctly classified as samples with low or high extractable contents of total phenols, flavanols and anthocyanins in seasons 2016 and 2017 by different chemometric tools.

Season	Chemometric tool	EPC ^a		EFC ^b		EAC ^c	
		Internal (%)	External (%)	Internal (%)	External (%)	Internal (%)	External (%)
2016	LDA ^d	65.6	48.1	68.8	59.3	59.4	55.6
	DPLS ^e	56.3	40.7	75.0	40.7	75.0	48.1
	Pearson ^f	68.8	59.3	46.9	37.0	59.0	59.0
2017	LDA ^d	87.0	44.4	91.3	44.4	91.3	33.3
	DPLS ^e	69.6	50.0	87.0	55.6	78.3	66.7
	Pearson ^f	73.9	50.0	56.5	72.2	73.9	61.1

^a EPC: extractable phenolic content.

^b EFC: extractable flavanol content.

^c EAC: extractable anthocyanin content.

^d LDA: linear discriminant analysis.

^e DPLS: discriminant partial least square.

^f Pearson: Pearson's similarity index.

spectral data acquisition. Moreover, a similar chemometric methodology was applied. Therefore, it is proven that the methodologies applied here, the measurement of whole grapes or grape skins in field with the MicroNIR system, is not as efficient as the in-lab hyperspectral methodology applied in our previous study.

In a further step, other qualitative approaches have been carried out to link the phenolic extractable contents in grape skins to their spectral features in the near infrared region.

3.3. Qualitative analysis

For qualitative analysis, the calibration sets of samples are the same described above for the quantitative one. Calibration sets were used to develop internal validations and the validation sets described above were used to develop external validations in this qualitative approach. As results of the qualitative analyses carried out (LDA, DPLS and Pearson's similarity index), different models for the prediction the extractable content level of phenolic, flavanolic and anthocyanic compounds (EPC, EFC and EAC) were obtained. The percentages of samples correctly classified in internal and external validation for each reference parameter and season are shown in Table 2.

Similar to quantitative results, the different approaches carried out for the discriminations of samples according to their level of extractable compounds show unremarkable results. Only internal validations in 2017 season show fairly good results (especially for LDA). However, these results are not consistent in the external validation procedure and percentages of correctly classified samples fall even more than in 2016 season. To easily compare the different chemometric tools applied, ROC (Receiver Operating Characteristic) curves have been plotted (Fig. 2).

ROC curves confirm the trends deduced from Table 2. The measurement of grape skin in quartz cuvettes, carried out in 2017 season, resulted in a slight improvement in the percentages of samples correctly classified according their EPC, EFC and EAC levels. However, this improvement does not seem to be enough for taking into account these models as useful ones.

3.4. Discussion

The influence of different error sources related to the varying conditions of field measurements should be considered. The environmental conditions of the vineyard (extreme temperature conditions in most of cases in a warm climate) maybe played a critical role on the obtained results. This factor is also a critical one not only in portable devices, but also for the benchtop ones. Although the sample collections were carried out early in the morning, there is an important gap between the

initial and final temperatures in the same collection session. Moreover, other factors that directly affect the performance of the spectroscopic system such as the berry size variation, the minimum number of berry samples to build the model, the heterogeneous phenolic distribution inside the berry or the range of the parameter to be assessed could influence the obtained results. The size and geometry of grapes combined with their low spectral reflectance can also be the factors responsible of these results. Grapes are small and spherical samples and therefore, they have a high curvature. Small size differences in the grapes can produce large differences in their curvature and, in consequence, in the reflectance that the MicroNiR device can measure. These might be the causes of the results obtained in 2016 season.

As mentioned above, to reduce this problem, a new measurement methodology was carried out in 2017 season. Grapes skins were placed at the bottom of quartz cuvettes for the spectra acquisition trying to minimize the differences in grape curvature. New models showed better results, although they were not good enough for considering them useful models. The different thickness of the grape skins samples might be contribute to as new source of these errors, especially when bare skins of reduced number of grapes are used as sample. It is well known that NIR radiation penetrates a millimeter or so into the sample, thus, differences in the thickness of the skins should have some influence on the collected spectra. In consequence, grapes, unlike other bigger or grounded samples, do not seem to be susceptible of being correctly measured by portable NIR spectrometers such as the described in this study.

4. Conclusion

A number of spectral pretreatments and MPLS calibrations were interrogated to develop quantitative models. Moreover, different chemometric strategies were performed to develop a qualitative analysis of the data. However, the procedure reported here does not present enough accuracy for the "in vineyard" screening of extractable polyphenols in red grape skins, although promising results have been obtained in our lab for other matrix [37] and for the same matrix using a similar benchtop methodology [18]. Although the aforesaid device has been developed for its use out of lab, vineyard environmental conditions (extreme temperature conditions in most of cases in a warm climate) maybe play a critical role on its use. This factor is also a critical one not only in portable devices, but also for the benchtop ones. Furthermore, heterogeneity of analyzed grapes and the own features of the berries (size, geometry or skin grape thickness) may also have influence on the obtained data and especial attention should be paid for further studies.

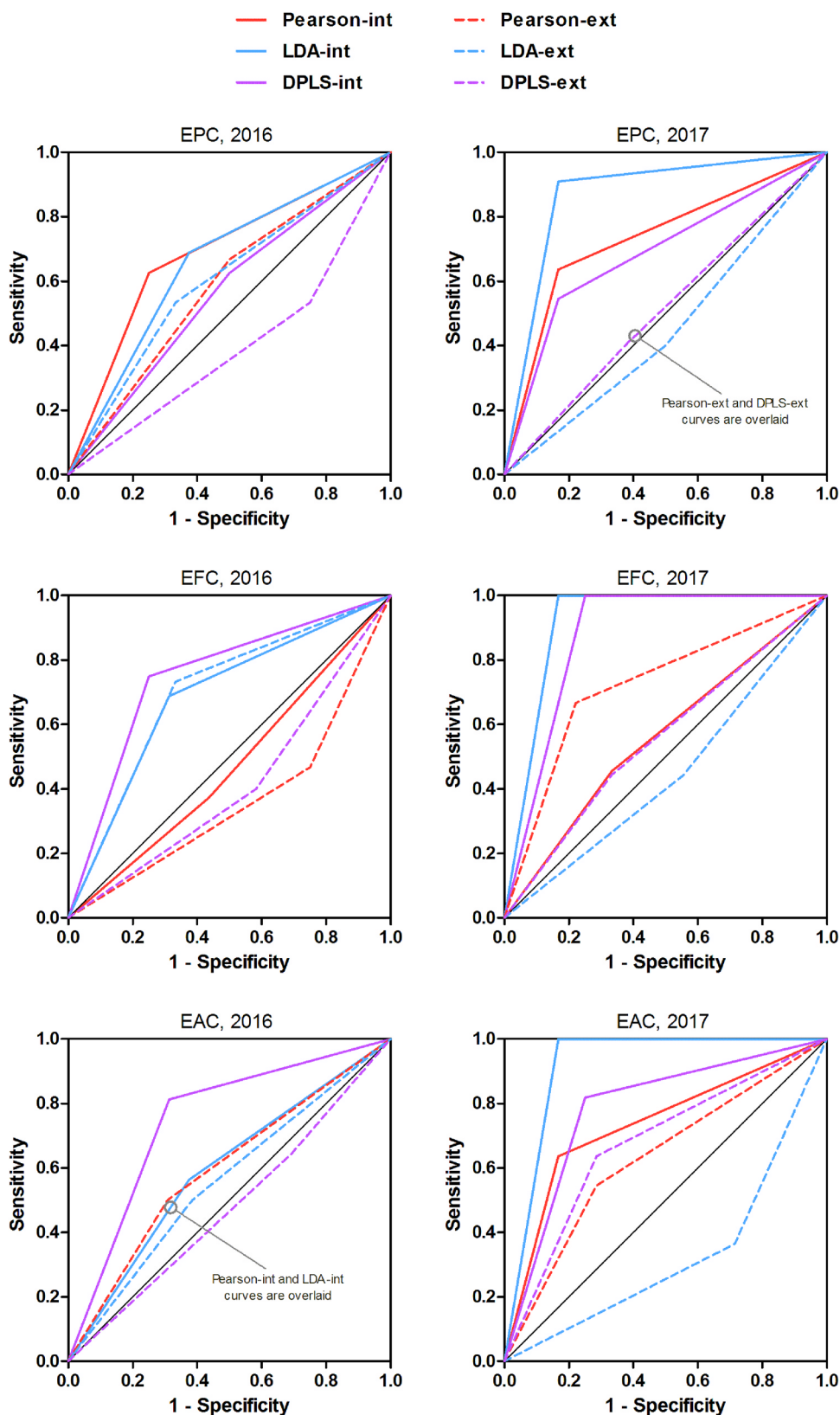


Fig. 2. Receiver operating characteristic (ROC) curves of different chemometric tools applied (LDA, DPLS and Pearson's similarity index) for each parameter (extractable total phenolic content, extractable flavanol content and extractable anthocyanin content) and each season (2016 and 2017). Internal and external validation results are shown.

Acknowledgments

The authors thank the technical staff of Biology Service [Servicios Generales de Investigación (SGI), Universidad de Sevilla].

Fundings

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad [project AGL-2014-58486-C2 and AGL-2017-84793-C2]; and Universidad de Sevilla [B. Baca-Bocanegra predoctoral grant (VPPI-II.2) and J. Nogales-Bueno postdoctoral grant (VPPI-II.4)]

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.talanta.2018.09.057.

References

- [1] A. Crozier, M.N. Clifford, H. Ashihara, *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell Publishing, Blackwell Publishing, Oxford, England, 2006.
- [2] R.E. Koes, F. Quattrocchio, J.N.M. Mol, The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution, *Bioessays* 16 (2) (1994) 123–132.
- [3] A.L. Waterhouse, *Wine Phenolics*, The New York Academy of Sciences, New York, New York, 2002.
- [4] C.A. Rice-Evans, J. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.* 2 (4) (1997) 152–159.
- [5] B. Gordillo, F.J. Rodríguez-Pulido, M.L. González-Miret, N. Quijada-Morín, J.C. Rivas-Gonzalo, I. García-Estévez, F.J. Heredia, M.T. Escribano-Bailón, Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin–flavonol–flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions, *J. Agric. Food Chem.* 63 (35) (2015) 7645–7653.
- [6] J. Nogales-Bueno, B. Baca-Bocanegra, M.J. Jara-Palacios, J.M. Hernández-Hierro, F.J. Heredia, Evaluation of the influence of white grape seed extracts as copigment sources on the anthocyanin extraction from grape skins previously classified by near infrared hyperspectral tools, *Food Chem.* 221 (2017) 1685–1690.
- [7] R.S. Jackson, *Chemical constituents of grapes and wine*, in: R.S. Jackson (Ed.), *Wine Science: Principles, Practice And Perception*, Academic Press, San Diego, California, 2000, pp. 232–280.
- [8] D. Fournand, A. Vicens, L. Sidhoum, J.M. Souquet, M. Moutounet, V. Cheynier, Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7331–7338.
- [9] F. Torchio, E. Cagnasso, V. Gerbi, L. Rolle, Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas, *Anal. Chim. Acta* 660 (1–2) (2010) 183–189.
- [10] I. Zouid, R. Siret, F. Jourjon, E. Mehinagic, L. Rolle, Impact of grapes heterogeneity according to sugar level on both physical and mechanical properties and their anthocyanins extractability at harvest, *J. Texture Stud.* 44 (2) (2013) 95–103.
- [11] D. Cozzolino, R.G. Damberg, L. Janik, W.U. Cynkar, M. Gishen, Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy, *J. Infrared Spectrosc.* 14 (5) (2006) 279–289.
- [12] R. Ferrer-Gallego, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, Feasibility study on the use of near infrared spectroscopy to determine flavanols in grape seeds, *Talanta* 82 (5) (2010) 1778–1783.
- [13] R. Ferrer-Gallego, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy, *LWT-Food Sci. Technol.* 44 (4) (2011) 847–853.
- [14] D. Cozzolino, M.J. Kwiatkowski, M. Parker, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, M. Gishen, M.J. Herderich, Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 513 (1) (2004) 73–80.
- [15] R.G. Damberg, D. Cozzolino, W. Cynkar, A. Kambouris, I. Francis, P.B. Høj, M. Gishen, The use of near infrared spectroscopy for grape quality measurement, 2003.
- [16] J. Herrera, A. Guesalaga, E. Agosin, Shortwave-near infrared spectroscopy for non-destructive determination of maturity of wine grapes, *Meas. Sci. Technol.* 14 (5) (2003) 689–697.
- [17] J.M. Hernández-Hierro, J. Nogales-Bueno, F.J. Rodríguez-Pulido, F.J. Heredia, Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening, *J. Agric. Food Chem.* 61 (41) (2013) 9804–9809.
- [18] J. Nogales-Bueno, B. Baca-Bocanegra, F.J. Rodríguez-Pulido, F.J. Heredia, J.M. Hernández-Hierro, Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins, *Food Chem.* 172 (2015) 559–564.
- [19] V. Gonzalez-Caballero, M.-T. Sanchez, J. Fernandez-Novales, M.-I. Lopez, D. Perez-Marin, On-vine monitoring of grape ripening using near-infrared spectroscopy, *Food Anal. Methods* 5 (6) (2012) 1377–1385.
- [20] R. Guidetti, R. Beghi, L. Bodria, Evaluation of frappe quality parameters by a simple VIS/NIR system, *Trans. ASABE* 53 (2) (2010) 477–484.
- [21] M. Larrain, A.R. Guesalaga, E. Agosin, A multipurpose portable instrument for determining ripeness in wine grapes using NIR spectroscopy, *IEEE Trans. Instrum. Meas.* 57 (2) (2008) 294–302.
- [22] R. Urraca, A. Sanz-García, J. Tardaguila, M.P. Diago, Estimation of total soluble solids in grape berries using a hand-held NIR spectrometer under field conditions, *J. Sci. Food Agric.* 96 (9) (2016) 3007–3016.
- [23] J. Nogales-Bueno, F.J. Rodríguez-Pulido, B. Baca-Bocanegra, M.L. González-Miret, F.J. Heredia, J.M. Hernández-Hierro, Hyperspectral Imaging - A Novel Green Chemistry Technology for the Oenological and Viticultural Sectors, (2016), pp. 45–56.
- [24] J. Nogales-Bueno, J.M. Hernández-Hierro, F.J. Rodríguez-Pulido, F.J. Heredia, Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach, *Food Chem.* 152 (2014) 586–591.
- [25] J.M. Hernández-Hierro, J. Nogales-Bueno, F.J. Rodríguez-Pulido, F.J. Heredia, Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening, *J. Agric. Food Chem.* 61 (41) (2013) 9804–9809.
- [26] J. Nogales-Bueno, F.J. Rodríguez-Pulido, F.J. Heredia, J.M. Hernández-Hierro, Comparative study on the use of anthocyanin profile, color image analysis and near-infrared hyperspectral imaging as tools to discriminate between four autochthonous red grape cultivars from La Rioja (Spain), *Talanta* 131 (2015) 412–416.
- [27] M. Urbano, M.D.L. de Castro, P.M. Perez, J. Garcia-Olmo, M.A. Gomez-Nieto, Ultraviolet-visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines, *Food Chem.* 97 (1) (2006) 166–175.
- [28] R. Ferrer-Gallego, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, A comparative study to distinguish the vineyard of origin by NIRS using entire grapes, skins and seeds, *J. Sci. Food Agric.* 93 (4) (2013) 967–972.
- [29] C.J. Bevin, R.G. Damberg, A.J. Fergusson, D. Cozzolino, Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis, *Anal. Chim. Acta* 621 (1) (2008) 19–23.
- [30] B. Gordillo, F.J. Rodríguez-Pulido, N. Mateus, M.L. Escudero-Gilete, M.L. Gonzalez-Miret, F.J. Heredia, V. de Freitas, Application of LC-MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region, *Anal. Chim. Acta* 732 (2012) 162–171.
- [31] V.L. Singleton, citation classic - colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Curr. Contents/Agric. Biol. Environ. Sci.* (48) (1985) (18–18).
- [32] N. Vivas, Y. Glories, L. Lagune, C. Saucier, M. Augustin, Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamaldéhyde, *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 28 (1994) 319–336.
- [33] M. García-Marino, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties, *Anal. Chim. Acta* 660 (1–2) (2010) 134–142.
- [34] R.G. Brereton, *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*, J. Wiley, Chichester, West Sussex, Engl. (2003).
- [35] J.S. Shenk, M.O. Westerhaus, *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*, NIRSystems, Silver Spring, Maryland, 1995.
- [36] J. Nogales-Bueno, B. Baca-Bocanegra, F.J. Rodríguez-Pulido, F.J. Heredia, J.M. Hernández-Hierro, Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins, *Food Chem.* 172 (2015) 559–564.
- [37] B. Baca-Bocanegra, J. Nogales-Bueno, J.M. Hernández-Hierro, F.J. Heredia, Screening of extractable polyphenols (extractable total phenolic and ellagitannin contents) in coorange byproducts: evaluation of portable micro near infrared spectroscopy technology, in: *Proceedings of the In Vino Analytica Scientia Symposium*, Salamanca, Spain, 2017.

CAPÍTULO 5: APLICACIÓN DE TECNOLOGÍA PORTÁTIL MICRO-NIRS AL ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA EXTRAÍBLE DE SUBPRODUCTOS DE TONELERÍA

En: Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; García Estévez, Ignacio; Escribano Bailón, María Teresa; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José: *Screening of wine extractable total phenolic and ellagitannin contents in revalorized cooperage byproducts: evaluation by Micro-NIRS technology*. Food and Bioprocess Technology, (en revisión).

1. Antecedentes

En los últimos años, la utilización de madera de roble como fuente natural de copigmentos en vinificación se ha convertido en una práctica enológica extendida. Los compuestos fenólicos de la madera se liberan al vino y pueden modificar propiedades organolépticas como el aroma, el color o la astringencia. La presencia en el vino de elagitaninos procedentes de la madera influye en la evolución de su color, tanto por su efecto protector de los antocianos frente a la oxidación, que favorece las reacciones de copigmentación flavanol-antociano, como por su combinación directa con los antocianos que conduce a una mayor estabilidad de los pigmentos (Chassaing, et al., 2010; Vivas, et al., 1996). Teniendo en cuenta lo anterior, la predicción del contenido de compuestos fenólicos de la madera y su capacidad de extracción desde la matriz al medio hidroalcohólico resulta de interés en la industria enológica.

Son conocidas las ventajas que las técnicas espectroscópicas tienen respecto a las técnicas tradicionales usadas en el sector vitivinícola para la predicción de distintos parámetros enológicos de interés (Ferrer-Gallego, et al., 2010; Ferrer-Gallego, et al., 2011; Hernández-Hierro, et al., 2013; Nogales-Bueno, et al., 2015) tal y como puede comprobarse además en los Capítulos 2 y 3 de esta memoria (Baca-Bocanegra, Nogales-Bueno, Heredia, y Hernandez-Hierro, 2018; Baca-Bocanegra, Nogales-Bueno, Hernandez-Hierro, y Heredia, 2018). Debido a los avances en la investigación, en los últimos tiempos se ha prestado considerable atención a la miniaturización y portabilidad de los dispositivos espectroscópicos. El espectrómetro MicroNIR Pro Lite 1700 es un potente instrumento que ofrece varias ventajas para el análisis no destructivo: pequeño tamaño, bajo coste, robustez, simplicidad de análisis, ergonomía de diseño y portabilidad, lo que evita el transporte de la muestra y por tanto mejora la preservación de la misma. Este equipo permite el desarrollo de nuevas aplicaciones que pueden implementarse en línea o *in situ*.

En la industria enológica, el desarrollo de modelos aplicables *in situ* permitirá una mayor versatilidad y eficiencia para la toma de decisiones en tiempo real en el proceso de vinificación

sobre la adecuación y/o dosificación de madera de roble, subproducto de tonelería, dependiendo de sus características espectrales y propiedades de extractabilidad.

2. Objetivo

El objetivo de este capítulo ha sido evaluar la viabilidad del uso de un dispositivo portátil miniaturizado de espectroscopía de infrarrojo cercano, con el fin de estimar *in situ* el contenido extraíble de fenoles totales y elagitaninos en viruta cruda de roble americano, subproducto de tonelería.

3. Parte experimental

Para la realización de este estudio se utilizó el conjunto de doscientas muestras de viruta cruda de roble americano (*Quercus alba* L.), utilizado en el Capítulo 3. La adquisición espectral se realizó utilizando un espectrofotómetro NIR portátil (MicroNIR Pro Lite 1700) que cubre el rango espectral entre 908 y 1676 nm. En este caso, dado que el equipo utilizado realiza una adquisición espectral puntual y no un barrido de la superficie de la muestra como en el caso de la cámara hiperespectral, se registraron seis réplicas espectrales para cada muestra, se calculó el espectro medio y se constituyó una matriz espectral formada por los espectros medios de cada una de las 200 muestras. Los espectros de cada muestra se calibraron utilizando un patrón de referencia Labsphere® como referencia blanca (100% de reflectancia), mientras que la corriente oscura (0% de reflectancia) se registró al aire, colocando el dispositivo a aproximadamente 0.5 metros de cualquier

En este capítulo se realiza un procedimiento analítico análogo al realizado en el Capítulo 3 con el objetivo de evaluar la espectroscopía NIR portátil para la predicción del contenido fenólico extraíble en virutas de roble americano y comparar los resultados con los obtenidos utilizando un equipo de sobremesa de características similares, debido a la importancia que este parámetro tiene en la industria enológica y a las ventajas que la portabilidad del equipo puede proporcionar en este campo.

Para la selección de muestras a través del análisis de componentes principales se tuvieron en cuenta 5 componentes principales que permitieron explicar el 96.23 % de la variabilidad espectral original. Se identificaron 10 *outliers* espectrales que se eliminaron del conjunto inicial de muestras. Las 190 muestras restantes fueron ordenadas en este espacio pentadimensional de acuerdo a su distancia de Mahalanobis (H) y se agruparon todas las muestras que tuvieran una distancia de Mahalanobis a la muestra vecina (NH) menor que 0.6, obteniéndose 18 grupos distintos de los cuales 3 estaban formados por una única muestra. En este caso se constituyeron

conjuntos de calibración y validación formados por 18 y 15 muestras respectivamente. Estos sets de muestras fueron utilizados, respectivamente, para realizar el calibrado mediante regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS) y la validación externa de los modelos desarrollados.

Se determinó el contenido extraíble de fenoles totales y elagitaninos en viruta de roble americano para las 33 muestras de viruta seleccionadas. Para ello, las muestras de viruta fueron maceradas durante tres días en vino sintético. Seguidamente, se determinó la concentración de los fenoles totales presentes en los extractos utilizando el método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton, et al., 1965) y la concentración de elagitaninos individuales siguiendo el método cromatográfico descrito por García-Estévez, et al. (2012). La suma de elagitaninos individuales fue expresada como elagitaninos totales.

Los modelos desarrollados para estimar el contenido extraíble de fenoles totales, elagitaninos totales, castalagina, vescalagina, granidina y roburina E, a partir de la información espectral y los valores de referencia calculados, ofrecen resultados satisfactorios obteniéndose coeficientes de determinación (RSQ) mayores de 0.9 y errores estándar de predicción (SEP) comprendidos entre 13.68% y 23.51% para todos los parámetros evaluados. Estos errores son comparativamente similares o incluso menores que los errores obtenidos previamente para el contenido total o extraíble de estos compuestos usando equipos de sobremesa (B. Baca-Bocanegra, et al., 2018; Giordanengo, et al., 2009).

Los métodos desarrollados se utilizaron para predecir los contenidos extraíbles de fenoles totales y elagitaninos en todas las muestras (190), sin tener en cuenta los *outliers* espectrales. En concordancia con los resultados obtenidos en el Capítulo 3, se aprecia una variabilidad sustancial de los parámetros evaluados dentro de cada grupo de muestras (A, B, C, D), además de diferencias en función de la dirección de procesado de las duelas con respecto a las fibras para obtener las virutas, siendo mayor el contenido fenólico extraíble en las muestras de los conjuntos A, B y C, obtenidas mediante procesados de las duelas en la dirección longitudinal de las fibras, que en aquellas obtenidas tras un procesado de las duelas en la dirección transversal (D).

4. Conclusiones

- El análisis espectral desarrollado utilizando el espectrómetro portátil MicroNIR constituye una técnica prometedora para la evaluación de rutina de los compuestos fenólicos extraíbles en el subproducto de tonelería, proporcionando resultados comparables e incluso menores que los obtenidos con equipos de sobremesa.
- La aplicación del modelo desarrollado confirma los resultados obtenidos en el Capítulo 3 en cuanto a la heterogeneidad en el contenido extraíble de compuestos fenólicos de

madera de roble: se observan diferencias entre las muestras obtenidas tras procesados de las duelas en dirección longitudinal y transversal de las fibras además de variabilidad de este parámetro dentro de cada grupo.

- El desarrollo de modelos aplicables *in situ* permitirá una mayor versatilidad y eficiencia para la toma de decisiones en el proceso de vinificación sobre la adecuación y/o dosificación de los subproductos de acuerdo con los requisitos del vino.

Food and Bioprocess Technology

Screening of wine extractable total phenolic and ellagitannin contents in revalorized cooperage byproducts: evaluation by MICRO-NIRS technology --Manuscript Draft--

Manuscript Number:									
Full Title:	Screening of wine extractable total phenolic and ellagitannin contents in revalorized cooperage byproducts: evaluation by MICRO-NIRS technology								
Article Type:	Original Research								
Keywords:	red wine; oak byproduct; phenolic compounds; ellagitannin; MICRO-NIRS								
Corresponding Author:	José Miguel Hernández-Hierro Universidad de Sevilla Sevilla, SPAIN								
Order of Authors:	Berta Baca-Bocanegra Julio Nogales-Bueno Ignacio García-Estévez María Teresa Escribano-Bailón José Miguel Hernández-Hierro Francisco José Heredia								
Corresponding Author Secondary Information:									
Corresponding Author's Institution:	Universidad de Sevilla								
Corresponding Author's Secondary Institution:									
First Author:	Berta Baca-Bocanegra								
First Author Secondary Information:									
Order of Authors Secondary Information:									
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2017-84793-C2)</td> <td>Not applicable</td> </tr> <tr> <td>Universidad de Sevilla (VPPI-II.2)</td> <td>Miss Berta Baca-Bocanegra</td> </tr> <tr> <td>Universidad de Sevilla (VPPI-II.4)</td> <td>Dr Julio Nogales-Bueno</td> </tr> <tr> <td>FEDER-Interreg España-Portugal Programme (0377_IBERPHENOL_6_E)</td> <td>Dr Ignacio García-Estévez</td> </tr> </table>	Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2017-84793-C2)	Not applicable	Universidad de Sevilla (VPPI-II.2)	Miss Berta Baca-Bocanegra	Universidad de Sevilla (VPPI-II.4)	Dr Julio Nogales-Bueno	FEDER-Interreg España-Portugal Programme (0377_IBERPHENOL_6_E)	Dr Ignacio García-Estévez
Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2017-84793-C2)	Not applicable								
Universidad de Sevilla (VPPI-II.2)	Miss Berta Baca-Bocanegra								
Universidad de Sevilla (VPPI-II.4)	Dr Julio Nogales-Bueno								
FEDER-Interreg España-Portugal Programme (0377_IBERPHENOL_6_E)	Dr Ignacio García-Estévez								
Abstract:	<p>The addition of commercial oak wood as copigments sources has been used to get high quality red wines in the last years. During the contact time, different oak compounds such as phenolic compounds are released from the wood to the wine, thus affecting its organoleptic properties such as aroma, color or astringency. Wood processing for the elaboration of barrels generates by-products which also seem to be interesting in the oenological field due to its potential capacity of release high added value compounds for wine.</p> <p>Determining phenolic compounds of wood and its extractability to the hydroalcoholic medium is important in the oenological industry. The method proposed in this study cope with this issue in an in situ, non-destructive and fast way. For this purpose, a number of oak by-product samples spectrally representative have been selected. Selected spectral data have been correlated with oak wood extractable polyphenols (extractable total phenolic content and extractable ellagitannin content) by modified partial least squares regression (MPLS) using a number of spectral pre-treatments. The obtained results are comparable with those obtained using bench top devices and</p>								

	<p>presents the advantage of its eventual friendly use out of lab. Development of applicable models in situ will allow a greater versatility and efficiency for the decision-making in the winemaking process on the adequacy and/or dosage of these byproducts according to the requirements of the wine. The use of cooperage by-products as source of copigments for wine leads to a sustainable and competitive cooperage industry, through waste reduction and by-product valorization.</p>
--	--

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Screening of wine extractable total phenolic and ellagitannin contents in revalorized cooperage byproducts: evaluation by MICRO-NIRS technology

Berta Baca-Bocanegra¹, Julio Nogales-Bueno¹, Ignacio García-Estévez², María Teresa
Escribano-Bailón², José Miguel Hernández-Hierro^{1,*} and Francisco José Heredia¹

¹Food Colour and Quality Laboratory, Á. Nutrición y Bromatología, Facultad de
Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain.

²Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Unidad de Nutrición y Bromatología,
Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

* **Corresponding author:** José Miguel Hernández-Hierro

Phone: +34 954556495

E-mail: jmhhierro@us.es

ABSTRACT

1
2 The addition of commercial oak wood as copigments sources has been used to get high
3
4 quality red wines in the last years. During the contact time, different oak compounds
5
6 such as phenolic compounds are released from the wood to the wine, thus affecting its
7
8 organoleptic properties such as aroma, color or astringency. Wood processing for the
9
10 elaboration of barrels generates by-products which also seem to be interesting in the
11
12 oenological field due to its potential capacity of release high added value compounds
13
14 for wine.
15
16

17
18
19 Determining phenolic compounds of wood and its extractability to the hydroalcoholic
20
21 medium is important in the oenological industry. The method proposed in this study
22
23 cope with this issue in an *in situ*, non-destructive and fast way. For this purpose, a
24
25 number of oak by-product samples spectrally representative have been selected.
26
27 Selected spectral data have been correlated with oak wood extractable polyphenols
28
29 (extractable total phenolic content and extractable ellagitannin content) by modified
30
31 partial least squares regression (MPLS) using a number of spectral pre-treatments.
32
33

34
35
36 The obtained results are comparable with those obtained using bench top devices and
37
38 presents the advantage of its eventual friendly use out of lab. Development of applicable
39
40 models *in situ* will allow a greater versatility and efficiency for the decision-making in
41
42 the winemaking process on the adequacy and/or dosage of these byproducts according
43
44 to the requirements of the wine. The use of cooperage by-products as source of
45
46 copigments for wine leads to a sustainable and competitive cooperage industry, through
47
48 waste reduction and by-product valorization.
49
50

51
52
53 **Keywords:** red wine, oak byproduct, phenolic compounds, ellagitannin, MICRO-NIRS
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

1
2 In grape berries, the balance between technological and phenolic parameters is a key
3
4 factor for obtaining quality red wines, especially in terms of their color. Anthocyanins
5
6 are the main responsible for the colour of red wines, and their interactions with other
7
8 phenolic compounds, called copigments, allow improving the color stabilization of aged
9
10 wines by copigmentation or stabilization reactions (Boulton 2001; Escribano-Bailón and
11
12 Santos-Buelga 2012). However, grapevine berries are commonly harvested on the base
13
14 of technological maturity parameters often without considering properly phenolic
15
16 maturity. Under warm climatic conditions, it is a usual pattern that grapes have high
17
18 sugar content but insufficient levels of phenolic compounds (pigments and copigments).
19
20
21 Wines made from these grapes are not able to form much copigmentation and as a
22
23 result, the color stabilization does not correctly develop and fall of color normally
24
25 occurred during winemaking maturation, especially when they are subjected to ageing
26
27 process (Boulton 2001; Ribéreau-Gayon et al. 2006).
28
29
30

31
32 The addition of commercial oak wood (Del Álamo et al. 2008; Nevares et al. 2008) or
33
34 wood compounds (Balík et al. 2017) have been aimed at implementing the production
35
36 of high quality red wines in the last years. During the contact time, different types of
37
38 oak compounds are released from the wood to the wine, thus affecting its organoleptic
39
40 properties such as aroma, color or astringency. Among these compounds, ellagitannins,
41
42 with several hydroxyl groups, can take part in oxidation reactions (Vivas and Glories
43
44 1996; Ignacio García-Estévez et al. 2017) that may favor the polymerization reactions
45
46 between flavanols and between flavanols and anthocyanins. Furthermore, they can
47
48 directly react with these types of compounds giving rise to flavanol-ellagitannins or
49
50 anthocyano-ellagitanins (Chassaing et al. 2010; Ignacio García-Estévez et al. 2013; I.
51
52 García-Estévez et al. 2013). Thus, ellagitannins may be involved in the changes of
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 colour during maturation and ageing of wine, helping to improve colour stability and
2 also protecting it against oxidation.
3

4 Wood processing for the elaboration of barrels generates by-products that seem to be an
5 interesting product in the oenological field due to its potential capacity of release high
6 added-value compounds for wine. Taking this into account, the use of barrel-shoot
7 wastes as a source of copigments for wine could become a sustainable and profitable
8 alternative to get high quality red wine for the oenological industry and to disposal of
9 their byproducts for the cooperage industry. In this sense, other products of the
10 oenological industry, as the grape pomace have been characterized for food waste
11 valorization (Páscoa et al. 2014).
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Predicting phenolic compounds of wood and its extractability from the matrix to the
24 hydroalcoholic medium could be important in the oenological industry. Accordingly,
25 chemical techniques, such as chromatography and mass spectroscopy, have been used in
26 several studies focused on evaluate the oak wood phenolic extraction process and how
27 is the extractability affected by factors as oak toasted degree or the type of aging
28 performed (Chira and Teissedre 2013; I. García-Estévez et al. 2015; Jourdes et al.
29 2011). These studies achieve very accurate results but they used destructive and time
30 consuming analyses that also require the use of chemical reagents. It is undesirable
31 when the work flow is relatively fast.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Vibrational spectroscopy techniques represent emerging analytical procedure, which are
46 enjoying increasing popularity in the industry as non-destructive, environmental
47 friendly and rapid technique. The different fields of application of these techniques
48 highlight its enormous versatility. In the oenological sector, the application of infrared
49 spectroscopy is well known and extended. Classic NIR spectroscopy has been used to
50 determine parameters in grapes such total polyphenols, extractable anthocyanins,
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 concentration of sugars, density (Kemps et al. 2010), total anthocyanins (Cozzolino et
2 al. 2006) and the main families of phenolic compounds (Ferrer-Gallego et al. 2011;
3 Ferrer-Gallego et al. 2010). In previous works carried out in our laboratory, near
4 infrared hyperspectral imaging has been used to develop screening methods in order to
5 measure phenols concentration in grape or grape seeds (Hernández-Hierro et al. 2013;
6 Nogales-Bueno et al. 2015; Rodriguez-Pulido et al. 2014). In a further step,
7 spectroscopic methods based on near-infrared spectroscopy have also shown great
8 potential for analyses of wood for oenological purposes. Giordanengo et al. (2009) used
9 classic NIR spectroscopy for the screening of extractable polyphenols in staves used to
10 manufacture barrels oak wood. Its use was then extended for the selection of oak for
11 oenology. So, Michel et al. (2013) carried out a validation of the aforesaid method by
12 means of the determination of ellagitannin content and organoleptic properties of wines
13 aging in wood barrels classified by NIRS. Finally NIR hyperspectral imaging has been
14 also used for the screening of the extractable polyphenolic compounds (extractable total
15 phenolic content) in wood cooperage byproduct by Baca-Bocanegra et al. (2018).

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36 However, despite the fast and effective proficiency of near-infrared spectroscopy to
37 predict different parameters in wine sector, most of these studies carried out *at lab*
38 imply sample transportation. To solve this problem and fulfill other sophisticated
39 conditions for its application in the industry, new generation of portable/handheld NIR
40 spectrometers have been developed within the last years. These systems incorporate the
41 analytical precision for chemical identification and quantitation with a spectral
42 resolution equivalent to bench-top instruments, allowing for flexibility for in-plant
43 analysis since the unit can be easily carried and transferred. In the agro-food industry
44 the potential of this technique has been highlighted for assessing the quality of fruits
45 nondestructively in the field under different weather conditions (Abu Izneid et al. 2014;
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Antonucci et al. 2011; Camps et al. 2012). In the viticulture sector, portable NIR
2 devices have been implemented for assessing and monitoring grape ripeness directly in
3 the field. Phenol ripening parameters such as the concentration of anthocyanins and
4 polyphenols have been evaluated (González-Caballero et al. 2012; Guidetti et al. 2010;
5 Larrain et al. 2008). However, references for the use of this technique in the analysis of
6 oak wood for oenological purposes have not been found. The development of applicable
7 models *in situ* will allow a greater versatility and efficiency for the real time decision-
8 making in the vinification process on the adequacy and / or dosage of these byproducts
9 depending on its spectral features and extractability properties.

10 The aim of this study was to develop a rapid and reliable method using a portable NIR
11 spectrometer for the screening of extractable polyphenols (extractable total phenolic and
12 ellagitannin contents) in cooperage byproduct. To our knowledge, this is the first time
13 that portable micro near infrared spectroscopy technology has been applied to face the
14 aforementioned goals.

15 **Material and methods**

16 *Samples*

17 American non-toasted oak (*Quercus alba* L.) shavings, cooperage byproduct, were used
18 for this study. Samples were provided by Tonelería Salas S.L. (Bollullos Par del
19 Condado, Huelva, Spain) and were collected as previously reported in Baca-Bocanegra
20 et al. (2018). Wood staves were seasoned under natural conditions in the open air during
21 24 months approximately before being used in the process of making barrels. In order to
22 achieve representative sample sets, the samples were taken at 4 different points in the
23 process of making barrels, so four samples were collected at each date (A, B, C and D).
24 Samples belonging to A, B and C groups are generated by different sawing processes of
25 the staves but always in the longitudinal direction of the fibers. In detail, an automatic

1 or manual processing of the staves is the only difference between the samples A and B
2 respectively. With respect to the group D, the samples are the result of a processing of
3 the staves in the transversal direction of the fibers. All sampling points are pre-molded
4 and pre-toasted of the staves. Samples were collected periodically, between June of
5 2015 and January of 2016. Two hundred samples were collected during the aforesaid
6 period. Upon receipt, the samples were sieved and subjected to the spectral analysis.
7 Wood shaving samples were screened using 2 mm and 10 mm mesh sieves placed in
8 tandem. Only shaves of each sample which were retained between them were taken into
9 account in the assay. After that, wood shavings were placed in stoppered plastics bags
10 and stored in a dry chamber until use.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 *Spectral data acquisition.*

25
26 The spectral reflectance data were collected using MicroNIR Pro Lite 1700 device
27 (VIAVI, Santa Rosa, California, USA), an instrument designed to measure diffuse
28 reflectance in the NIR region of the electromagnetic spectrum. The MicroNIR owes its
29 small size to the novel thin-film linearly variable filter (LVF) used as the dispersive
30 element. The LVF is directly coupled to a linear detector array (128-pixel uncooled
31 InGaAs photodiode array), covering the spectral range between 908 and 1676 nm
32 (spectral resolution of 6.2 nm). The filter coating in the LVF is wedged in one direction
33 and as a result of the varying film thickness; the wavelength transmitted through the
34 filter varies linearly in the direction of the wedge. The LVF makes each pixel of the
35 detector respond to a different wavelength. This ultra-compact spectroscopic engine is
36 coupled with a tungsten lamps diffuse illumination system. An image of the MicroNIR
37 spectrometer and MicroNIR's optical designed, adapted from VIAVI user manual, is
38 provided in Online Resource 1.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Spectra were recorded using 9.3 ms as integration time and 100 as scan count using the
2 instrument acquisition software MicroNIR™ Pro v.2.2 (VIAVI, Santa Rosa,
3 California, USA). A two-point reflectance calibration was used. A spectralon® ceramic
4 tile was used as a white reference (100% reflectance), whereas dark current (0%
5 reflectance) was recorded by taking a measurement placing the device about 0.5 meters
6 from any object.
7

8
9 Six replicates spectra were recorded for each sample and were exported in Log (1/R)
10 units and subsequently the average of the replication spectra was calculated. The
11 procedure was repeated for each sample and the obtained spectra were combined into
12 the spectral matrix.
13

14 *Chemical analysis*

15 Total phenol and ellagitannin extractabilities were determined for oak wood samples. In
16 order to perform this determination, wood shavings were immersed in a model wine
17 hydroalcoholic solution (4 g L⁻¹ tartaric acid, 12.5% ethanol, adjusted at pH 3.6 with
18 NaOH 0.5 M) for a maceration period of 72 h at room temperature and without
19 agitation. Oak wood shavings were added to the wine-like solution in a 4 g L⁻¹ ratio.
20 This supernatant was used in all of the following reference analysis.
21

22 Extractable total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method
23 (Singleton and Rossi 1965). The absorbance was recorded at 765 nm after 2 hours of
24 reaction. This measure was performed in duplicate on an Agilent 8453 UV–visible
25 spectrophotometer (Palo Alto, USA), equipped with diode array detection (DAD).
26 Gallic acid was used as a standard for construction of the calibration curve and the
27 concentration of total phenols was expressed as gallic acid equivalent in mg g⁻¹ of
28 wood.
29

30 Extractable ellagitannin content (castalagin, vescalagin, grandinin, and roburin E) were
31

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

determined using the HPLC-DAD-MS method presented by I. García-Estévez et al. (2012). HPLC analyses were performed in a Hewlett-Packard 1100 series liquid chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Detection was carried out at 250 nm as the preferred wavelength. Spectra were recorded from 220 to 600 nm. MS detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an ESI source and a triple-quadrupole linear ion trap mass analyzer that was controlled by Analyst 5.1 software (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). All analyses were performed in duplicate. Standards of castalagin, vescalagin, grandinin, and roburin E were extracted from *Q. petraea* oak chips and purified as it is described by García-Estévez and co-workers (I. García-Estévez et al. 2010).

Data analysis

An unsupervised pattern recognition technique, principal component analysis (PCA), was used in order to provide information about the latent structure of spectral matrix and to find spectral differences among all spectral samples. This method provides not only information related to spectral outliers and the distribution of samples in the newly-created space, but is also an important source of knowledge with which to create cross-validation groups used in the calibration process (Brereton 2003; Shenk and Westerhaus 1995). PCA was also used to select representative samples from the spectral data set. Mahalanobis distances (H) for each sample were calculated and samples were grouped according their neighborhood H values (NH).

Different spectral pretreatments were tested to eliminate effects of unwanted signals of spectra and also to enhance subtle differences between different samples. Scattering effects were removed using standard normal variate (SNV), multiplicative scatter correction (MSC) and detrending (Geladi, MacDougall, & Martens, 1985; Dhanoa,

1 Lister, & Barnes, 1995). Moreover, the effect of differentiation and variations in
2 spectral ranges were tested in the development of the NIRS calibrations.
3

4 Using the raw spectral data, applying spectral pretreatments and allocating the
5 corresponding extractable total phenolic content and extractable ellagitannin content to
6 each sample, calibrations were performed by modified partial least squares regression
7 (MPLS). In this method, the group of calibration samples is divided into a series of
8 subsets in order to perform cross-validation to set the number of PLS factors, reduce the
9 possibility of over fitting (Shenk and Westerhaus 1995) and remove chemical outliers.
10 Using the $T \geq 2.5$ criterion, samples that presented a high residual value when they were
11 predicted were eliminated from the set. Finally, validation errors are combined into a
12 single figure, the standard error of cross-validation (SECV).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 The software used was Win ISI[®] (v1.50) (Infrasoft International, LLC, Port. Matilda,
26 PA, USA). This software allowed the data pretreatment, principal components analysis
27 and sample selection and development of quantitative models.
28
29
30
31
32

33 **Results and discussion**

34 *Exploratory analysis of spectra*

35
36 Fig.1a shows the raw average spectra regarding the sampling point of oak wood
37 shavings. It can be seen that wood samples belonging to A, B, C and D groups have
38 different reflectance intensities along some wavelength regions, although with the same
39 pattern.
40
41
42
43
44
45
46
47

48 A SNV (2,5,5,1) spectral pre-treatment was applied to the spectra of all samples in the
49 908–1676 nm region and after that, principal component analysis was carried out in
50 order to provide information about the latent structure of spectral matrix. PCA was also
51 used in this study to select representative samples from the spectral data set. Sample
52 selection was made in order to reduce the number of samples maintaining as much
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 spectral variety as possible. Using all spectral samples, five principal components were
2 taken into account. More than ninety-five per cent of the spectral variability of the
3 original spectral matrix was explained (96.23 %). In this five-dimensional space, the
4 samples were sorted according to Mahalanobis distances (H). Then, ten spectral outliers
5 ($H > 3$) were found and removed from this matrix. The 190 remaining samples were
6 grouped according their neighborhood H values ($NH \leq 0.6$ criterion). So, 18 groups with
7 different spectral characteristics were created. One sample from every group was
8 allocated in the calibration set. Therefore, 18 samples were selected to develop a
9 calibration process. In addition, to create the validation set, another sample from every
10 group was selected. Only 15 samples were allocated in this set because 3 of the 18
11 created groups had not more than one sample.

12 Fig.1b shows the scores of the wood samples in the space defined by the first and
13 second principal components which described 53.37 % (PC1) and 30.37 % (PC2) of the
14 spectral variability in the data. In the scores plot, the samples are represented by a color
15 code according to the cutting direction of the staves to obtain them (longitudinal or
16 transversal to the fibers). It can be seen that PC1 could be used to differentiate between
17 longitudinal and transversal group. Furthermore, it also possible to appreciate a
18 successful separation between samples according to the different staves processed to
19 obtain them, in other words, the different sampling points (A, B, C, D) (Fig.1c).
20 Samples belonging to A and B groups have been obtained in the same way (an
21 automatic or manual processing of the staves is the only difference between them) and,
22 therefore, it appears partly overlapping in this plot. Fig.1d shows the scores of the
23 calibration and validation samples in the space defined by PC1 and PC2. This space is
24 not entirely the same as the space used to select the calibration and validation sets
25 (bearing in mind that 5 PCs were used). However, in this figure, it can be appreciated

1 how both the calibration set and the validation set are homogenously allocated in the
2 space defined by PC1 and PC2 including almost all the spectral variability of samples
3 and, therefore, representing the heterogeneity of the whole set.
4
5

6
7 *Quantitative analysis.*
8

9 After HPLC-MS method, 4 ellagitannins were determined (castalagin, vescalagin,
10 grandinin and roburin E) and individual extractable ellagitannin contents were obtained.
11

12 The sum of all them was also expressed as total ellagitannins. From a quantitative point
13 of view, castalagin and vescalagin are the most abundant ellagitannins in oak wood but
14 lyxose/xylose derivatives (grandinin and roburin E) are also present. Oak wood
15 extractable total phenolic content has also been quantified using a spectrophotometric
16 method. Table 1 shows the main statistical descriptors for the reference parameters of
17 the samples allocated in the calibration set.
18

19 Quantitative calibrations were developed by modified partial least squares (MPLS)
20 regression. Extractable total phenolic content and extractable ellagitannin content were
21 used as dependent (Y) variables and the matrix of 18 wood processed spectra was used
22 as the independent (X). The statistical parameters of the final calibration equations are
23 shown in Table 2 where N is the number of samples used to obtain the calibration
24 equation after eliminating samples for chemical reasons (T criterion). The best of the
25 different mathematical treatments, the range of application, and standard deviations are
26 also shown.
27

28 The robustness of the selected models was tested using validation set samples, which
29 did not belong to the calibration set, as external validation. Samples which presented
30 reference values outside the applicability of the obtained models for each reference
31 parameter were not used in this procedure. In the case of the total phenols parameter all
32 sample presented reference values inside the applicability of the obtained model,
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 however, 2, 2, 5, 3 and 1 samples were not used for castalagin, vescalagin, grandinin,
2 roburin E and total ellagitannin validations, respectively. Table 3 shows the main
3 statistical descriptors for the reference parameters of the samples allocated in the
4 validation set after remove from the validation set the samples that should not be
5 predicted by the calibration models. Calibration model obtained was applied and the
6 predicted values were compared with the reference data. As result of this external
7 validation the standard errors of prediction (SEP) were obtained for each reference
8 variable, these values were also included in Table 2. These values are comparatively
9 similar or even better than the errors previously reported for total or extractable content
10 of these compounds using near infrared spectroscopy bench top devices taking into the
11 account the applicability range (Baca-Bocanegra et al. 2018; Giordanengo et al. 2009).

12 Fig.2 shows the loadings resulting of the MPLS model for total phenols as example and
13 it indicates the most dominant wavelengths. The spectral region between 1100 and 1200
14 showed important contribution to the model loadings. These could be related to
15 combination band of O–H functional group and symmetric and anti-symmetric
16 stretching vibration. This wavelength region is also related to C–H aromatic second
17 overtones and C–H third overtones vibration. These can be attributed to the chemical
18 structure of phenolic compounds (Osborne et al. 1993; Siesler et al. 2002). Combination
19 band of C–H aromatic appears in the spectral region between 1350 and 1450 nm.
20 Moreover, the first O–H stretching overtone contributes to spectrum at 1400 nm, hence
21 the moisture affects expansively to this band. Definitive attribution of absorbances
22 around 1400 nm is difficult given that absorptions around this wavelength range
23 originate from both -OH and -CH structures.

Use of developed method for the screening of extractable polyphenols

1
2 The methods developed in the preceding section were used to predict the extractable
3
4 content of total phenols and total ellagitannins in the whole of wood set. The results
5
6 show a substantial variability in the reference parameters within each group of samples
7
8 (Fig.3). The variability of oak wood extractives has been demonstrated by different
9
10 authors (Doussot et al. 2002; Snackers et al. 2000). Phenols content has been found to
11
12 vary even from the same provenance, the same tree and the same piece of timber
13
14 (Masson et al. 1995). Zahri et al. (2008) reported that total phenols content in wood
15
16 varied according to the distance from the oak tree pith. This observation confirmed
17
18 previous studies which determined that the concentration of soluble tannins in oak tree
19
20 decrease with age tree. A large amount of tannins and phenolic monomers in wood can
21
22 form polymers and copolymers with cell-wall components with time and then their
23
24 solubility would be reduced (Peng et al. 1991; Viriot et al. 1994).

25
26 In addition, an inter group variability of oak wood extractives has been found. Samples
27
28 generated by a processed of the staves in the longitudinal direction of the fibers hold
29
30 higher extractable polyphenols content than those obtained after processing staves in the
31
32 transversal direction. On the basis of these results, it can be assumed that the structure
33
34 of the samples could be involved in these extractable content differences.

Conclusion

35
36 The MPLS model performed confirmed that spectral analysis developed from
37
38 MicroNIR is a promising technique for *in situ* routine assessment of the extractable
39
40 polyphenolic compounds in wood cooperage byproduct. This methodology was able to
41
42 predict, *in situ*, the extractable polyphenolic content of a sample based on spectral
43
44 features as the predictor variables. The obtained results are comparable with those
45
46 obtained using other bench-top devices and presents the advantage of its eventual
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 friendly use out of lab. The use of a portable micro spectrometer implies very
2 interesting features, since at a lower cost objective and instantaneous spectroscopic
3 measurements can be carried out *in situ* with the advantage of its portability, due to its
4 small size. Development of applicable models *in situ* will also allow a greater versatility
5 and efficiency for the decision-making in the winemaking process on the adequacy and /
6 or dosage of these byproducts according to the requirements of the wine.
7

8
9
10
11
12
13
14 The use of cooperage by-product as source of copigments for wine is a sustainable and
15 profitable alternative to get high quality red wine for the oenological industry and to
16 disposal of their byproducts for the cooperage industry.
17

18
19
20
21 The variability in oak wood extractives within the same provenance has been observed.
22
23 Moreover, extractable polyphenols content differences between wood samples
24 generated by longitudinal and transversal cutting of the fibers have been also found.
25
26 Nonetheless, a comprehensive study should be made in order to obtain more
27 information about how wood structure and / or morphology changes within different
28 levels of phenolic compounds extractability.
29
30
31
32
33
34

35 **Acknowledgments**

36
37
38 The Spanish Ministerio de Economía y Competitividad is thanked for project
39 AGL2017-84793-C2. Universidad de Sevilla is thanked for B. Baca-Bocanegra
40 predoctoral grant (VPPI-II.2) and J. Nogales-Bueno postdoctoral grant (VPPI-II.4). I.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

García-Estévez thanks FEDER-Interreg España-Portugal Programme (Project ref. 0377_IBERPHENOL_6_E) for his postdoctoral grant. The authors thank the technical staff of Biology Service [Servicios Generales de Investigación (SGI), Universidad de Sevilla]. They also thank Tonelería Salas S.L. (Bollulos Par del Condado, Huelva, Spain) for supplying the cooperage byproduct samples.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

- 1
2 Abu Izneid, B., Fadhel, M. I., Al-Kharazi, T., Ali, M., & Miloud, S. (2014). Design and
3
4 develop a nondestructive infrared spectroscopy instrument for assessment of
5
6 mango (*Mangifera indica*) quality. *Journal of Food Science and Technology-*
7
8 *Mysore*, 51(11), 3244-3252
9
10
- 11 Antonucci, F., Pallottino, F., Paglia, G., Palma, A., D'Aquino, S., & Menesatti, P.
12
13 (2011). Non-destructive Estimation of Mandarin Maturity Status Through
14
15 Portable VIS-NIR Spectrophotometer. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5),
16
17 809-813
18
19
20
- 21 Baca-Bocanegra, B., Nogales-Bueno, J., Hernández-Hierro, J. M., & Heredia, F. J.
22
23 (2018). Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage
24
25 byproduct by near infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 244, 206-
26
27 212
28
29
30
- 31 Balík, J., Híc, P., Kulichová, J., Novotná, P., Tříška, J., Vrchotová, N., et al. (2017).
32
33 Musts with Increased Lignan Content Through Addition of Lignan Extracts.
34
35 *Food and Bioprocess Technology*, 10(7), 1367-1373
36
37
38
- 39 Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red
40
41 wines. A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-
42
43 87
44
45
- 46 Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics : data analysis for the laboratory and chemical*
47
48 *plant*. Chichester, West Sussex, England: J. Wiley.
49
50
- 51 Camps, C., Simone, C., & Gilli, C. (2012). Assessment of Tomato Quality Using
52
53 Portable NIR Spectroscopy and PLSR with Wavelengths Selection. *Acta*
54
55 *Horticulturae*, 936, 437-442
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Cozzolino, D., Damberg, R. G., Janik, L., Cynkar, W. U., & Gishen, M. (2006).
Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy. *Journal of Near
Infrared Spectroscopy*, 14(5), 279-289
- Chassaing, S., Lefeuvre, D., Jacquet, R., Jourdes, M., Ducasse, L., Galland, S., et al.
(2010). Physicochemical studies of new anthocyano-ellagitannin hybrid
pigments: about the origin of the influence of oak C-glycosidic ellagitannins on
wine color. *European Journal of Organic Chemistry*, 1, 55-63
- Chira, K., & Teissedre, P.-L. (2013). Extraction of oak volatiles and ellagitannins
compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected
to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food Chemistry*, 140(1-
2), 168-177
- Del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., & Merino, S. (2008). Aging
markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Anal Chim
Acta*, 621(1), 86-99
- Doussot, F., De Jéso, B., Quideau, S., & Pardon, P. (2002). Extractives Content in
Cooperage Oak wood during Natural Seasoning and Toasting; Influence of Tree
Species, Geographic Location, and Single-Tree Effects. *Journal of Agricultural
and Food Chemistry*, 50, 5955-5961
- Escribano-Bailón, M. T., & Santos-Buelga, C. (2012). Anthocyanin Copigmentation -
Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines.
[Article]. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 715-723
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón,
M. T. (2010). Feasibility study on the use of near infrared spectroscopy to
determine flavanols in grape seeds. *Talanta*, 82(5), 1778-1783

- 1 Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón,
2 M. T. (2011). Determination of phenolic compounds of grape skins during
3 ripening by NIR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 847-
4 853
5
6
7
8
9
10 García-Estévez, I., Alcalde-Eon, C., Le Grottaglie, L., Rivas-Gonzalo, J. C., &
11 Escribano-Bailón, M. T. (2015). Understanding the ellagitannin extraction
12 process from oak wood. *Tetrahedron*, 71(20), 3089-3094
13
14
15
16
17 García-Estévez, I., Alcalde-Eon, C., María Martínez-Gil, A., Rivas-Gonzalo, J. C.,
18 Teresa Escribano-Bailón, M., Nevares, I., et al. (2017). An Approach to the
19 Study of the Interactions between Ellagitannins and Oxygen during Oak Wood
20 Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6369-6378
21
22
23
24
25
26
27 García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & Alcalde-Eon, C.
28 (2010). Development of a fractionation method for the detection and
29 identification of oak ellagitannins in red wines. *Anal Chim Acta*, 660(1-2), 171-
30 176
31
32
33
34
35
36
37 García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & Alcalde-Eon, C.
38 (2012). Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins
39 in wine samples. [Article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6),
40 1373-1379
41
42
43
44
45
46
47 García-Estévez, I., Gavara, R., Alcalde-Eon, C., Rivas-Gonzalo, J. C., Quideau, S.,
48 Escribano-Bailón, M. T., et al. (2013). Thermodynamic and Kinetic Properties
49 of a New Myrtillin–Vescalagin Hybrid Pigment. *Journal of Agricultural and*
50 *Food Chemistry*, 61(47), 11569-11578
51
52
53
54
55
56
57 García-Estévez, I., Jacquet, R., Alcalde-Eon, C., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-
58 Bailón, M. T., & Quideau, S. (2013). Hemisynthesis and Structural and
59
60
61
62
63
64
65

- Chromatic Characterization of Delphinidin 3-O-Glucoside-Vescalagin Hybrid Pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47), 11560-11568
- Giordanengo, T., Charpentier, J. P., Boizot, N., Roussel, S., Roger, J. M., Chaix, G., et al. (2009). Oakscan: procédé de mesure rapide et non destructif des polyphénols du bois de chêne de tonnellerie. *Revue française d'Oenologie*, 10-15
- González-Caballero, V., Sánchez, M.-T., Fernández-Novales, J., López, M.-I., & Pérez-Marín, D. (2012). On-Vine Monitoring of Grape Ripening Using Near-Infrared Spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 5(6), 1377-1385
- Guidetti, R., Beghi, R., & Bodria, L. (2010). Evaluation of frape quality parameters by a simple VIS/NIR system *Transactions of the Asabe*, 53(2), 477-484
- Hernández-Hierro, J. M., Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F. J., & Heredia, F. J. (2013). Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9804-9809
- Jourdes, M., Michel, J., Saucier, C., Quideau, S., & Teissedre, P. L. (2011). Identification, amounts, and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1531-1539
- Kemps, B., Leon, L., Best, S., De Baerdemaeker, J., & De Ketelaere, B. (2010). Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering*, 105(4), 507-513
- Larrain, M., Guesalaga, A. R., & Agosin, E. (2008). A multipurpose portable instrument for determining ripeness in wine grapes using NIR spectroscopy. *Ieee Transactions on Instrumentation and Measurement*, 57(2), 294-302

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Masson, G., Moutounet, M., & Puech, J. L. (1995). Ellagitannin content of oak wood as a function of species and of sampling position in the tree. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 262-268
- Michel, J., Jourdes, M., Le Floch, A., Giordanengo, T., Mourey, N., & Teissedre, P. L. (2013). Influence of wood barrels classified by NIRS on the ellagitannin content/composition and on the organoleptic properties of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 11109-11118
- Nevarés, I., Del Alamo, M., Cárcel, L. M., Crespo, R., Martín, C., & Gallego, L. (2008). Measure the Dissolved Oxygen Consumed by Red Wines in Aging Tanks. *Food and Bioprocess Technology*, 2(3), 328-336
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Heredia, F. J., & Hernández-Hierro, J. M. (2015). Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins. *Food Chemistry*, 172, 559-564
- Osborne, B. G., Fearn, T., Hindle, P. T., & Osborne, B. G. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Harlow, Essex, England; New York: Longman Scientific & Technical ; Wiley.
- Páscoa, R. N. M. J., Machado, S., Magalhães, L. M., & Lopes, J. A. (2014). Value Adding to Red Grape Pomace Exploiting Eco-friendly FT-NIR Spectroscopy Technique. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 865-874
- Peng, S., Scalbert, A., & Monties, B. (1991). Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, 30(3), 775-778
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., Glories, Y., Maujean, A., et al. (2006). *Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications* (Vol. v. 1). West Sussex, England: J. Wiley & Sons.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Rodriguez-Pulido, F. J., Hernández-Hierro, J. M., Nogales-Bueno, J., Gordillo, B., Gonzalez-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2014). A novel method for evaluating flavanols in grape seeds by near infrared hyperspectral imaging. *Talanta*, 122, 145-150
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995). *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*. Silver Spring, Maryland: NIRSystems.
- Siesler, H. W., Ozaky, Y., Kawata, S., & Heise, H. M. (2002). *Near infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*(16), 144-158
- Snackers, G., Nepveu, G., Guilley, E., & Cantagrel, R. (2000). Geographic, silvicultural and individual variabilities of extractive content for French sessile oaks (*Quercus petraea* Liebl.): polyphenols, octalactones and volatile phenols. *Annals of Forest Science*, 57(3), 251-260
- Viriote, C., Scalbert, A., Hervé du Penhoat, C. L. M., & Moutounet, M. (1994). Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut dimerization and hydrolysis during wood ageing. *Phytochemistry*, 36(5), 1253-1260
- Vivas, N., & Glories, Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 103-107
- Zahri, S., Moubarik, A., Charrier, F., Chaix, G., Bailleres, H., Nepveu, G., et al. (2008). Quantitative assessment of total phenol contents of European oak (*Quercus*

petraea and Quercus robur) by diffuse reflectance NIR spectroscopy on solid
wood surfaces. *Holzforschung*, 62(6), 679-687

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

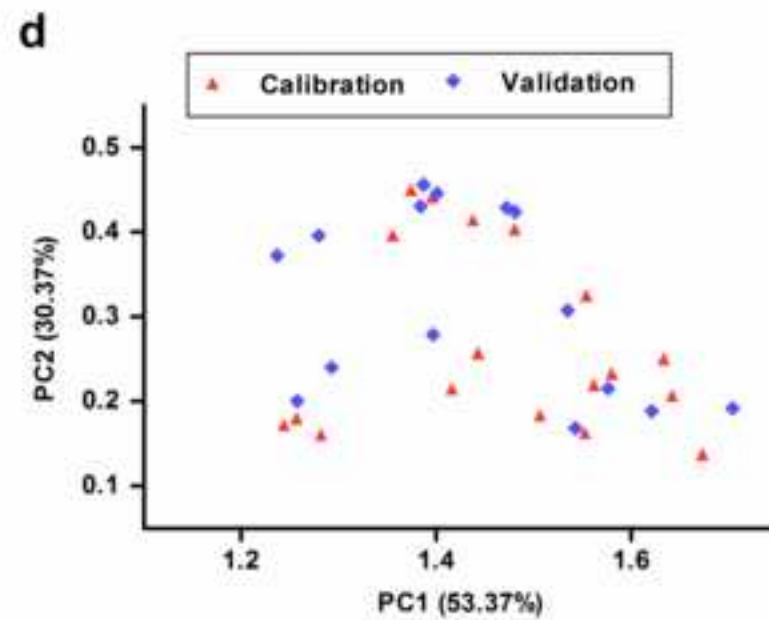
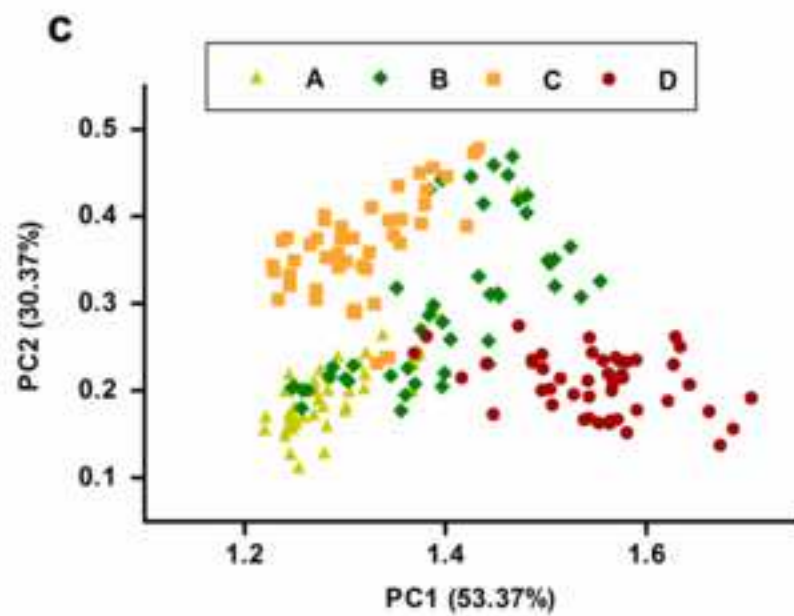
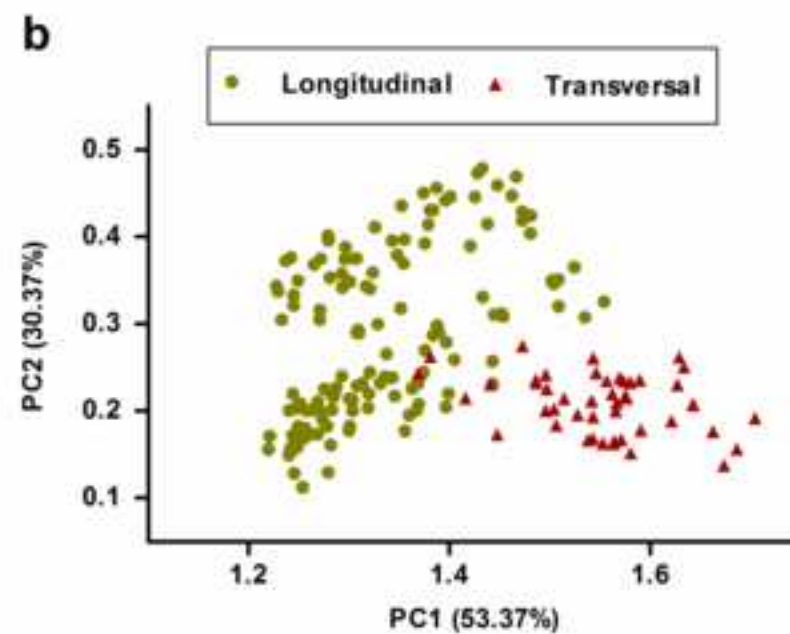
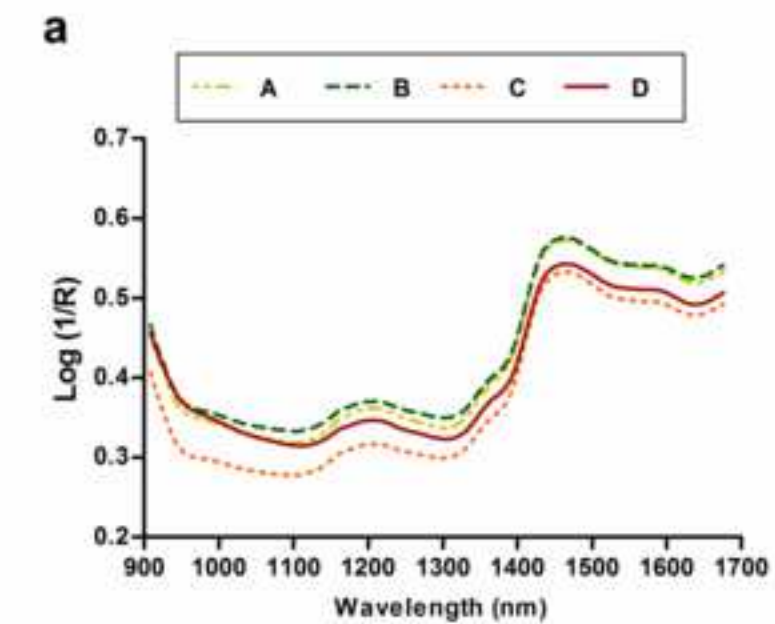
Figure captions¹

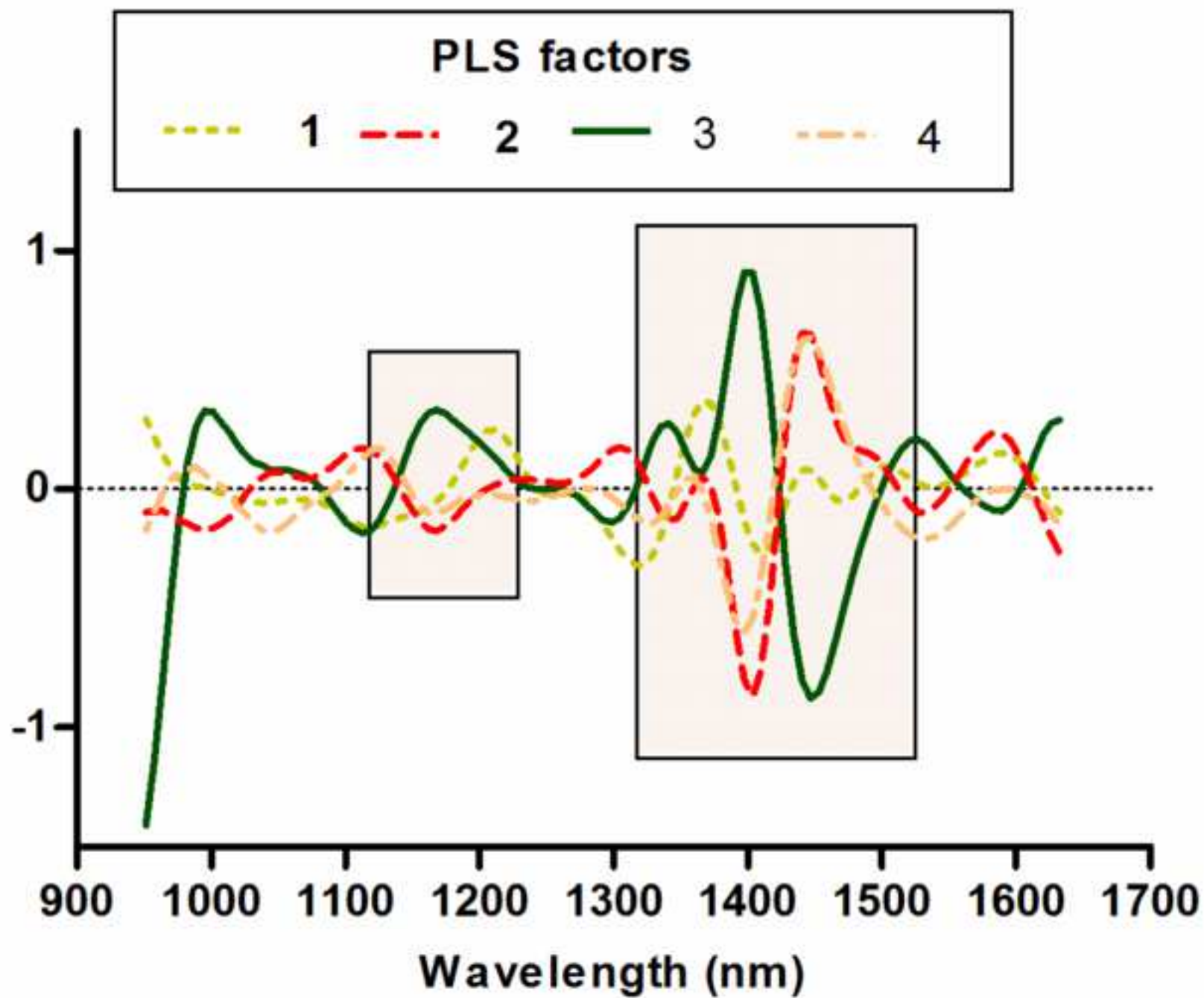
1
2 **Fig. 1** (a) Raw average spectra of wood samples according to sampling point. (b) Score
3
4 plot of wood samples codified as longitudinal and transversal samples in the space
5
6 defined by PC1 and PC2 (c) codified according to sampling point (A, B, C and D) (d)
7
8 Score plot of wood samples codified as calibration and validation sets in the space
9
10 defined by PC1 and PC2
11
12

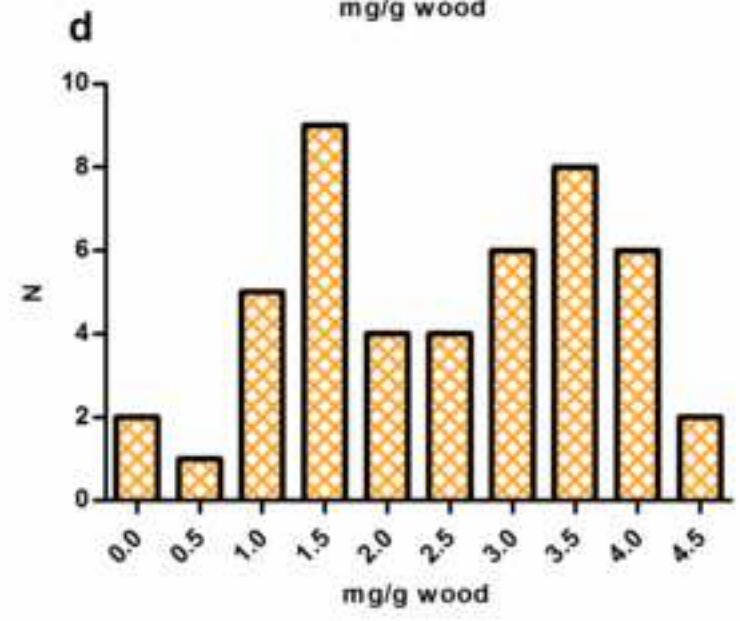
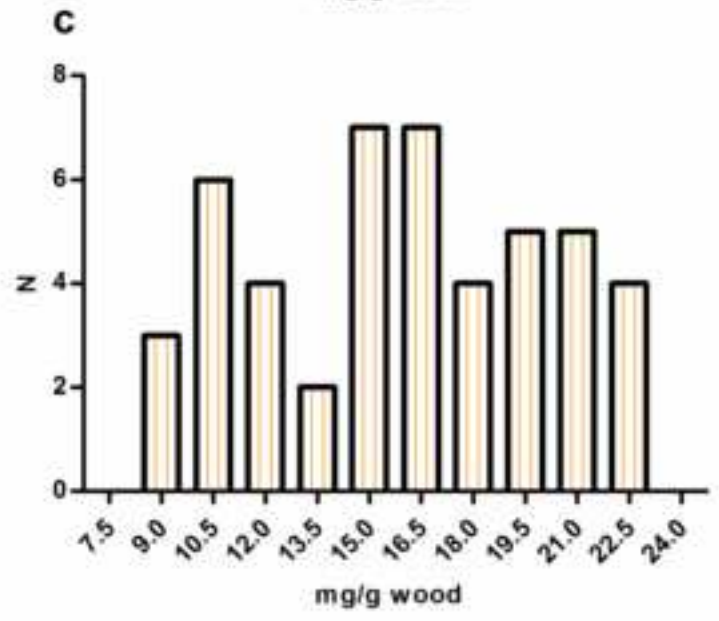
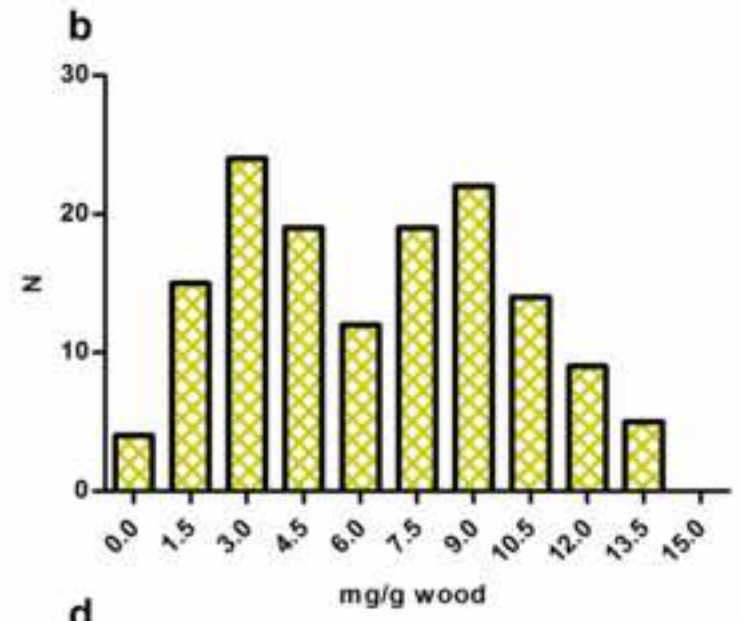
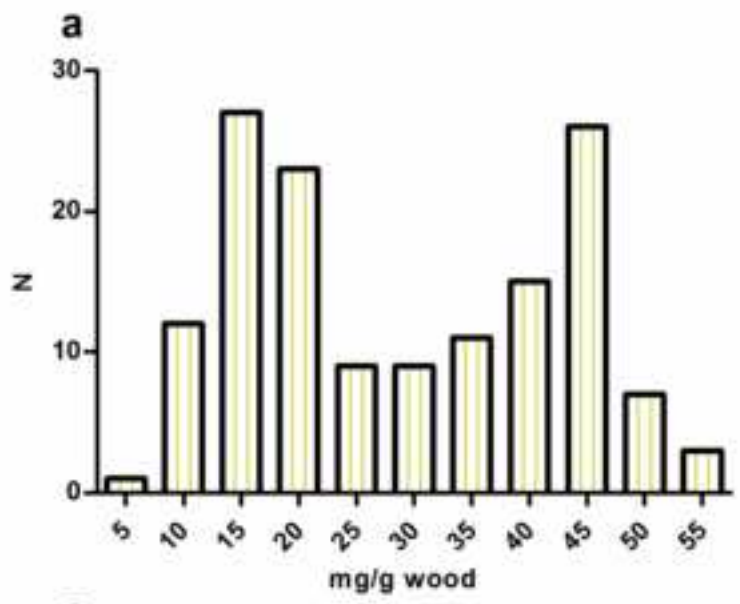
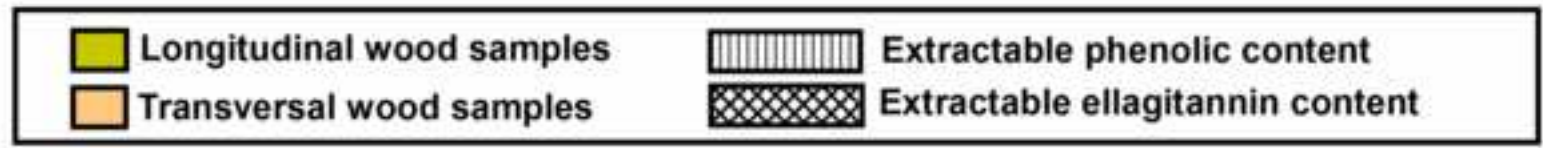
13
14 **Fig. 2** Loadings plot for the PLS factors of the regression model for extractable total
15
16 phenolic content prediction
17
18

19 **Fig. 3** Distribution of longitudinal and transversal wood samples in different extractable
20
21 phenolic content (a and c) and extractable ellagitannin content (b and d)
22
23
24
25

26 1 NOTE: All figures should be in color on the Web and in black-and-white in print.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65







Screening of wine extractable total phenolic and ellagitannin contents in revalorized cooperage byproducts: evaluation by MICRO-NIRS technology

Food and Bioprocess Technology

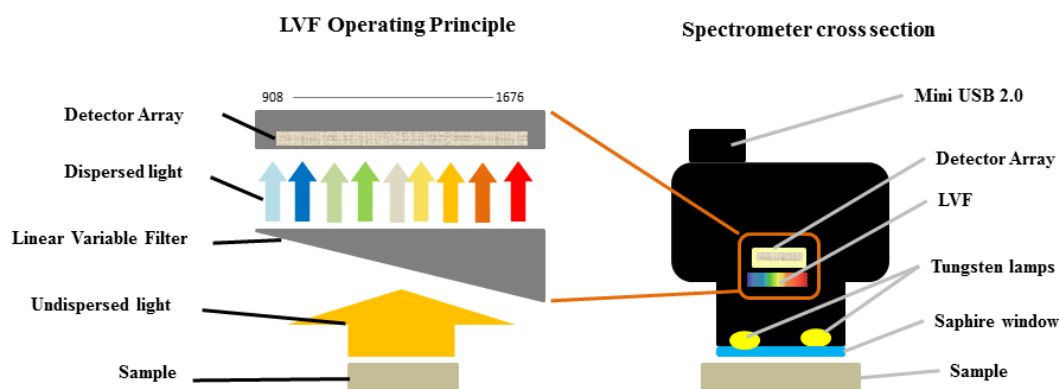
Berta Baca-Bocanegra¹, Julio Nogales-Bueno¹, Ignacio García-Estévez², María Teresa Escribano-Bailón²,

José Miguel Hernández-Hierro^{1,*} and Francisco José Heredia¹

* **Corresponding author:** José Miguel Hernández-Hierro

Phone: +34 954556495

E-mail: jmhierro@us.es



ESM_1. Illustration of the optical design and cross section of the MicroNIR operated in diffuse reflection mode adapted from VIAVI user manual.

Table 1. Main statistical descriptors for reference parameters in calibration set.

Set	Reference Parameters	N ^a	Maximum	Mean	Minimum	SD ^b
Calibration	EPC ^c	18	59.56	23.79	9.41	15.67
	EEC ^d	18	16.15	5.07	1.49	4.66
	Castalagin	18	6.62	2.03	0.52	1.99
	Vescalagin	18	6.94	2.01	0.60	1.86
	Gradinin	18	1.74	0.71	0.18	0.58
	Roburin E	18	0.85	0.31	0.08	0.26

^aN: number of samples; ^bSD: Standard deviation; ^cEPC: extractable total phenolic content (mg g⁻¹ of wood, expressed as gallic acid equivalents); ^dEEC: extractable total ellagitannin content (mg g⁻¹ of wood, expressed as sum of individual ellagitannins);

Table 2. Calibration statistical descriptors for the models developed in the NIR zone close to 908-1676 nm.

Reference Parameter	Spectral pretreatment	T outliers	PLS factors	N ^a					RSQ ^d		
					Est. Min	SD ^b	Est. Max	SEC ^c		SECV ^e	SEP ^f
					(mg g ⁻¹ wood)				(mg g ⁻¹ wood)		
EPC ^g	SNV 2,5,5,1	0	4	18	0	14.92	68.23	2.07	0.98	3.83	5.86
EEC ^h	Standard MSC 1,5,5,1	0	2	18	0	4.66	19.04	1.30	0.92	1.76	2.07
Castalagin	Standard MSC 1,5,5,1	0	2	18	0	1.99	8.00	0.66	0.90	0.85	0.90
Vescalagin	None 1,5,5,1	1	2	17	0	1.44	6.04	0.36	0.94	0.53	0.71
Gradinin	Detrend 2,5,5,1	2	3	16	0	0.55	2.34	0.09	0.98	0.13	0.16
Roburin E	Standard MSC 1,5,5,1	0	2	18	0	0.30	1.16	0.08	0.91	0.11	0.13

^aN: number of samples (calibration set); ^bSD: standard deviation; ^cSEC: standard error of calibration; ^dRSQ: coefficient of determination (calibration set); ^eSECV: standard error of cross-validation (7 cross-validation groups); ^fSEP: standard error of prediction (external validation); ^gEPC: extractable total phenolic content (mg g⁻¹ of wood, expressed as gallic acid equivalents); ^hEEC: extractable total ellagitannin content (mg g⁻¹ of wood, expressed as sum of individual ellagitannins)

Table 3. Main statistical descriptors for reference parameters in validation set.

Set	Reference Parameters	N ^a	Maximum	Mean	Minimum	SD ^b
Validation ^c	EPC ^c	15	56.54	32.03	11.26	17.73
	EEC ^d	14	14.44	7.50	1.40	4.49
	Castalagin	13	5.50	2.91	0.51	1.73
	Vescalagin	13	4.85	2.82	0.67	1.53
	Gradinin	10	1.57	0.83	0.25	0.48
	Roburin E	12	0.78	0.43	0.09	0.26

^aN: number of samples; ^bSD: Standard deviation; ^cEPC: extractable total phenolic content (mg g⁻¹ of wood, expressed as gallic acid equivalents); ^dEEC: extractable total ellagitannin content (mg g⁻¹ of wood, expressed as sum of individual ellagitannins); ^eValidation: statistical descriptors for the reference parameters of the samples allocated in the validation set after remove the samples that presented reference values outside the applicability of the calibration models.

CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN SUBPRODUCTOS DE TONELERÍA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En: Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Gorey, Brian; Heredia Mira, Francisco José; Byrne, Hugh J.; Hernández Hierro, José Miguel: *On the use of vibrational spectroscopy and scanning electron microscopy to study phenolic extractability of cooperage byproducts in wine*. Food Chemistry, (en revisión).

1. Antecedentes

Factores como la cantidad de compuestos potencialmente extraíbles, el tiempo de contacto entre la madera y el vino y el procesado de la misma (método de obtención de las duelas, secado, tratamientos químicos o grado de tostado) pueden condicionar la extracción de los compuestos fenólicos de la madera (Fernández De Simón, Cadahía, Conde, y García-Vallejo, 1999; Guchu, Díaz-Maroto, Pérez-Coello, González-Viñas, y Ibáñez, 2006; Mosedale, et al., 1999; Puech, et al., 1999). Los distintos tratamientos a los que se somete la madera durante el proceso de elaboración de las barricas producen cambios en la estructura de la pared celular tanto de las duelas como de los subproductos obtenidos a partir de ellas, facilitando o dificultando, por tanto, la liberación de los compuestos extraíbles de la madera que se encuentran entrelazados con los polímeros que constituyen la pared celular o bien como inclusiones en los lúmenes celulares. Por lo tanto, el contenido fenólico extraíble de la madera puede verse afectado tanto por la cantidad de compuestos potencialmente extraíbles como por la facilidad /dificultad de extracción de los mismos.

Siguiendo este razonamiento, resulta interesante conocer los cambios que se producen en la estructura de la pared celular de muestras de viruta de madera con diferentes niveles de extractabilidad fenólica.

El análisis espectral y el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano han demostrado ser herramientas útiles para predecir el contenido total y contenido extraíble de fenoles totales en muestras de madera de roble (B. Baca-Bocanegra, et al., 2018; Giordanengo, et al., 2009; Zahri, et al., 2008). Sin embargo, la complejidad de esta región del espectro, donde aparecen solapados numerosos sobretonos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales limita la utilidad de esta zona del espectro para la determinación estructural y por tanto, para el estudio de la relación entre la extractabilidad de compuestos fenólicos y la estructura

de la matriz. Es en la región del infrarrojo medio donde aparecen picos más intensos y mejor definidos, correspondientes a las vibraciones fundamentales de estos enlaces (Bokobza, 1998). La espectroscopía vibracional, que comprende espectroscopía infrarroja y Raman son técnicas complementarias entre sí, que permiten estudiar la información molecular desde dos puntos de vista distintos (Byrne, et al., 2011) ofreciendo una huella característica de cada molécula (Byrne, et al., 2014).

Puede considerarse de interés utilizar la espectroscopía vibracional para intentar relacionar las características estructurales observadas con dichas técnicas con la extractabilidad de compuestos fenólicos en muestras de viruta cruda de roble americano. La microscopía electrónica de barrido (SEM) puede aportar información complementaria y útil para este propósito a través de la caracterización topográfica de las muestras.

2. Objetivos

El objetivo de este capítulo ha sido estudiar mediante espectroscopía vibracional y microscopía electrónica de barrido la relación existente entre la estructura de la pared celular y la extractabilidad fenólica en virutas de roble americano, subproducto de tonelería.

3. Parte experimental

Para este estudio se han utilizado 18 muestras de viruta de roble americano, subproducto de tonelería, seleccionadas espectralmente utilizando un espectrómetro NIR portátil MicroNIR™ (908-1676 nm), a partir de un conjunto inicial de 200 muestras (Capítulo 5). En este conjunto existen muestras de virutas generadas tras el procesado de las duelas en dirección longitudinal y transversal de las fibras, dos categorías que serán tenidas en cuenta en el análisis e interpretación posterior de los resultados.

Cada una de las muestras seleccionadas fue sometida a una extracción en vino sintético durante un periodo de tres días tras el cual el residuo sólido se retiró y se liofilizó. El residuo sólido liofilizado se sometió a una extracción exhaustiva en una disolución acuosa de metanol al 50% y posteriormente fue de nuevo liofilizado y almacenado en desecador hasta la realización de las medidas espectrales. Para cada uno de los extractos obtenidos, ya fueran en vino sintético o en metanol, se determinaron los fenoles totales siguiendo el método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton, et al., 1965). Se determinó la extractabilidad de fenoles totales para cada muestra como la relación porcentual entre lo extraído en vino sintético y el total extraído como suma de ambos procesos. A partir de la extractabilidad de fenoles totales las muestras fueron clasificadas en tres grupos con valores de extractabilidad de fenoles totales bajos, medios y altos. Las *muestras control* (muestras de viruta que no han sido sometidas a la extracción fenólica) y el

material no extraíble (residuo sólido, proveniente de las muestras de viruta, obtenido tras las extracciones) se midieron espectroscópicamente mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía Raman. Las medidas en infrarrojo se realizaron utilizando un accesorio de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) en la región comprendida entre 650 y 4000 cm^{-1} . Utilizando un accesorio de imágenes y un objetivo de cristal de germanio en contacto con la muestra, se adquirieron además las imágenes espectrales ATR-FTIR de las muestras. Las medidas Raman se realizaron excitando las muestras con un láser a 785 nm y registrando el espectro obtenido desde 200 a 3600 cm^{-1} . En las medidas puntuales se realizaron 6 réplicas para cada muestra. Todos los espectros fueron pretratados, o bien mediante una corrección de los efectos multiplicativos de la dispersión (MSC) para los espectros FTIR o mediante una eliminación de la línea base para los espectros Raman. En ambos casos se calculó el espectro medio de cada muestra como promedio de las 6 medidas anteriormente mencionadas. Las imágenes ATR-FTIR se normalizaron para ajustar las variaciones en la absorbancia punto a punto y permitir la comparación entre muestras. Las muestras control fueron además analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) con el objetivo de analizar la topografía de la superficie.

Con objeto de buscar tendencias dentro de la matriz de espectros *control* FTIR se aplicó un análisis de componentes principales (PCA). El segundo componente principal permite diferenciar entre las muestras de alta y baja extractabilidad fenólica mientras que las muestras pertenecientes al grupo de extractabilidad media se solapa con los dos grupos anteriores. PC2 también permite observar una separación de las muestras longitudinales de aquellas obtenidas tras un procesado de las duelas en la dirección transversal de las fibras. Teniendo en cuenta los pesos (*loadings*) obtenidos para el segundo componente principal, se identificó una serie de zonas espectrales donde se concentraba la mayor parte de la variabilidad espectral del conjunto de datos que se atribuyeron a polisacáridos, lignina y compuestos fenólicos (Faix, 1992; Karim, Daryaei, Torkaman, Oladi, Ghanbary, y Bari, 2016; Pandey y Theagarajan, 1997; Schultz y Glasser, 1986). Atendiendo a los *loadings* de PC2, las características positivas de los mismos, atribuidas en este PCA a las muestras de alto contenido fenólico, están relacionadas principalmente con compuestos fenólicos y lignina mientras que las características negativas de los *loadings* anteriormente mencionados, atribuidas a las muestras de baja extractabilidad están relacionadas con celulosa y hemicelulosa.

Para confirmar los resultados anteriores, se seleccionaron las longitudes de onda adjudicadas a polisacáridos (1000-1100 cm^{-1}) y lignina (1500-1800 cm^{-1} y 2700-3000 cm^{-1}) como regiones espectrales que podrían influir la extractabilidad fenólica de la madera y, por lo tanto, se consideraron en las imágenes ATR-FTIR para encontrar diferencias en la estructura de las muestras en función de la extractabilidad fenólica. La diferencia en las distribuciones estructurales

de los constituyentes corrobora la propuesta de que no solo el contenido químico, sino también la estructura de las muestras de madera juegan un papel significativo en la determinación de la extractabilidad fenólica.

Los espectros y las imágenes ATR FTIR del *material no extraíble* fueron sometidos al mismo tratamiento de datos que los correspondientes a las muestras control. Después de la extracción de los compuestos fenólicos se sigue observando en el segundo componente principal una separación de las muestras de baja y alta extractabilidad. Como en el caso de las muestras control, en las puntuaciones del PC2, los picos atribuidos a lignina son intensos en muestras de alta capacidad de extracción, mientras que los atribuidos a celulosa/hemicelulosa son prominentes para muestras de baja capacidad de extracción. La intensidad de los picos relacionados con los compuestos fenólicos en las puntuaciones del PC2 se reduce significativamente en el material no extraíble con respecto a las muestras control. Igual que en el caso de las muestras de control, en las imágenes ATR-FTIR se observa un alto grado de variación de los niveles de absorbancia entre las distintas muestras.

Con el fin de confirmar y/o complementar los hallazgos obtenidos utilizando ATR-FTIR se analizaron los espectros Raman de las muestras control siguiendo el mismo procedimiento que en los datos de ATR FTIR. Las principales características de estos espectros fueron relacionadas con polisacáridos, lignina y compuestos fenólicos (Agarwal, 2014; Colares, Pastore, Coradin, Camargos, Moreira, Rubim, et al., 2015; Jason y Emily, 2012; Larsen y Barsberg, 2010) y tras el PCA se aprecia un ligero grado de separación entre las muestras de alta y baja extractabilidad, en este caso de acuerdo con PC1.

Finalmente, las micrografías de las muestras de alta y baja extractabilidad fenólica obtenidas por microscopía electrónica de barrido muestran diferencias morfológicas entre la estructura de estos dos grupos de muestras que podrían estar relacionadas con los diferentes niveles de extractabilidad fenólica. Este comportamiento podría explicarse probablemente por los diferentes cortes a los que se han sometido las duelas para obtener las muestras (longitudinales y transversales). En este sentido, debe tenerse en cuenta que la mayoría de las muestras de alta capacidad de extracción pertenecen al conjunto longitudinal, mientras que el conjunto transversal consiste principalmente en muestras de baja extractabilidad.

4. Conclusiones

- La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y la espectroscopía Raman proporcionan información complementaria sobre la composición y la estructura de la madera. Se ha confirmado que las muestras con mayor contenido de lignina en la pared celular conducen a una alta extractabilidad, mientras que una mayor cantidad de polisacáridos está relacionada con menores niveles de extractabilidad
- La espectroscopía de imágenes ATR FTIR se ha utilizado con éxito para evaluar la distribución de los distintos componentes de la pared celular de la muestra. Los mapas de distribución presentan diferencias características entre muestras de alta y baja extractabilidad, especialmente en tres intervalos específicos de longitud de onda: 1000-1100 cm^{-1} , 1500-1750 cm^{-1} y 2700-3000 cm^{-1} .
- La microscopía electrónica de barrido permite observar diferencias morfológicas en la estructura según el nivel de extractabilidad. Las micrografías muestran estructuras más porosas en las virutas de corte longitudinal, lo que se corresponde con mayores niveles de extractabilidad fenólica.

Manuscript Number:

Title: On the use of vibrational spectroscopy and scanning electron microscopy to study phenolic extractability of cooperage byproducts in wine

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: red wine; oak wood; phenolic extractability; ATR-FTIR spectroscopy; Raman spectroscopy; scanning electron microscopy

Corresponding Author: Professor Francisco José Heredia, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidad de Sevilla

First Author: Berta Baca-Bocanegra

Order of Authors: Berta Baca-Bocanegra; Julio Nogales-Bueno, PhD; Brian Gorey, PhD; Francisco José Heredia, PhD; Hugh J. Byrne, PhD; José Miguel Hernández-Hierro, PhD

Abstract: Wood is an important source of phenolic compounds, which can be transferred to wine during ageing process, improving its properties, from an organoleptic point of view. Therefore, understanding and optimising the extractability of phenolic compounds from the wood is crucial in the oenological field.

The structural composition of oak wood samples has been evaluated using vibrational spectroscopy methods, and their main spectral features have been linked to phenolic compound extractabilities. To support the analysis, microscopic images of the samples were also recorded using scanning electron microscopy (SEM).

The applied methodology is shown to be useful to relate the wood cell wall structure to phenolic extractability levels of wood samples. It could assist in selecting oak wood suited for improving wine quality with regard to its colour or/and stability through the addition of external copigments to wine and deeply understanding the phenolic extraction process from wood to this beverage



Prof. P. Finglas
Editor in chief of Food Chemistry
Dept. Food and Nutritional Sciences
University of Reading

Sevilla, July 19, 2018

Dear Editor,

Following your recommendation, please find enclosed the new version of our manuscript **entitled** “On the use of vibrational spectroscopy and scanning electron microscopy to study phenolic extractability of cooperage byproducts in wine”. First at all, we acknowledge your effort and hope that, in the revised form, the manuscript would be appropriate for publication in Food Chemistry.

Wood is an important source of phenolic compounds, which can be transferred to wine during ageing process, improving its properties, from an organoleptic point of view. Therefore, understanding and optimising the extractability of phenolic compounds from the wood is crucial in the oenological field to use this byproduct as extra source of polyphenols that may improve wine quality with regard to its colour or/and stability.

In the present study, the structural composition of oak wood samples has been evaluated using Raman and attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopies, and their main spectral features have been linked to phenolic compound extractabilities, as measured by classic chemical analyses. To support the analysis, microscopic images of the samples were also recorded using scanning electron microscopy (SEM).

The applied methodology are shown to be useful to relate the wood cell wall structure to phenolic extractability levels of wood samples. It could assist in selecting oak wood suited for improving wine quality through the addition of external copigments to wine and deeply understanding the phenolic extraction process from wood to this beverage.

I look forward to hearing from you.

Yours faithfully,

Francisco J. Heredia

Highlights

- Wine extractability of phenolic compounds from wood has been determined
- Oak wood Fourier transform infrared (FTIR) and Raman spectra were acquired
- Microscopic images of the samples were recorded using scanning electron microscopy.
- Spectral and microscopic features were linked to phenolic extractabilities
- It could help wine industry to improve process efficiency and enhance wine quality

23 **ABSTRACT**

24 Wood is an important source of phenolic compounds, which can be transferred to wine
25 during ageing process, improving its properties, from an organoleptic point of view.
26 Therefore, understanding and optimising the extractability of phenolic compounds from
27 the wood is crucial in the oenological field.

28 The structural composition of oak wood samples has been evaluated using vibrational
29 spectroscopy methods, and their main spectral features have been linked to phenolic
30 compound extractabilities. To support the analysis, microscopic images of the samples
31 were also recorded using scanning electron microscopy (SEM).

32 The applied methodology is shown to be useful to relate the wood cell wall structure to
33 phenolic extractability levels of wood samples. It could assist in selecting oak wood
34 suited for improving wine quality with regard to its colour or/and stability through the
35 addition of external copigments to wine and deeply understanding the phenolic
36 extraction process from wood to this beverage.

37 **Keywords**

38 red wine; oak wood; phenolic extractability; ATR-FTIR spectroscopy; Raman
39 spectroscopy; scanning electron microscopy.

40

41 **1. Introduction**

42 Increasing demand on high quality red wines by the consumers represents a matter of
43 concern for the wine industry. The balance between technological and phenolic
44 parameters is a key factor for obtaining quality red wines. However, under warm
45 climatic conditions, it is a usual pattern the wine colour instability over time (Gordillo,
46 Rodriguez-Pulido, Mateus, Escudero-Gilete, Gonzalez-Miret, Heredia, et al., 2012) due
47 to the different levels of both phenolic and sugar maturity that exist at the moment of
48 harvesting (Mira de Orduña, 2010; Mori, Sugaya, & Gemma, 2005). Under these
49 conditions, copigmentation phenomena, which contribute to colour stabilization, are
50 hampered by the shortfall of pigments and copigments (Boulton, 2001).

51 Wood is an important source of phenolic compounds, which can be transferred to wine
52 during the ageing process, improving its properties, from an organoleptic point of view
53 (colour, astringency, bitterness). In view of this, oak barrels and their alternatives
54 (staves, chips, shaves...) are widely used in winemaking as a source of copigments in
55 order to achieve high quality red wines (Bautista-Ortín, Lencina, Cano-López, Pardo-
56 Mínguez, López-Roca, & Gómez-Plaza, 2008; B. Gordillo, Baca-Bocanegra,
57 Rodriguez-Pulido, Lourdes Gonzalez-Miret, Garcia Estevez, Quijada-Morin, et al.,
58 2016).

59 Phenolic compounds are an important group of substances in the plant kingdom.
60 However, despite their significance, these compounds are part of the so-called
61 extractable fraction that represents only a low percentage of oak wood composition,
62 cellulose, hemicelluloses and lignin being the major constituents (Eriksson, Blanchette,
63 & Ander, 1990; Morrell & Gartner, 1998) and the structural basis of wood cell wall.

64 The characteristics of wines that have been macerated with wood depend on the amount
65 of phenolic compounds in the wood but also on the amount of these compounds than

66 can be extracted from the wood to the wine. Factors such as oak species or geographic
67 origin have been shown to affect the chemical composition of the oak wood (Del Álamo
68 Sanza & Nevares Domínguez, 2006; Fernández de Simón, Cadahía, del Álamo, &
69 Nevares, 2010; Frangipane, Santis, & Ceccarelli, 2007), and even different anatomical
70 parts of wood may differ in terms of concentration and composition (Colares, Pastore,
71 Coradin, Marques, Moreira, Alexandrino, et al., 2016). Moreover, phenolic content has
72 been found to vary even from the same provenance, the same tree and the same piece of
73 timber (Masson, Moutounet, & Puech, 1995). The extraction of compounds from wood,
74 especially those of low molecular weight, depends mainly on the quantity of compounds
75 that are potentially extractable, on the contact time between the wine and wood, as well
76 as on the processing of the wood to be used in winemaking: how the staves are
77 obtained, the method of seasoning, chemical treatments and the degree of oak toasting.
78 Compounds constituting the extractable fraction can be contained within the polymers
79 in the cell wall and as inclusions in the cell lumens and therefore the amount of phenolic
80 compounds extracted from wood to the wine may vary due to differences in the quantity
81 of compounds that are potentially extractable but can also be affected by the
82 easy/difficulty of extraction. In view of this, it is important to evaluate and understand
83 the relationship between cell wall structure and the extraction degree of phenolic
84 compounds, that is to say, how wood structure and/or morphology changes within
85 different levels of phenolic compounds extractability. It could assist in selecting oak
86 wood suited for improving wine quality through the addition of external copigments to
87 wine.

88 Vibrational spectroscopic techniques, both infrared (IR) and Raman, are powerful
89 analytical tools for materials characterization. As the vibrational energy levels of each
90 molecule correspond to a specific pattern of stretching and bending motions, the

91 infrared and Raman spectra offer a characteristic fingerprint of the molecule (Byrne,
92 Ostrowska, Nawaz, Dorney, Meade, Bonnier, et al., 2014). Although both techniques
93 provide chemical information based on molecular vibrational motions, they show
94 different molecular responses, and so complement each other. Thus, it is possible to
95 evaluate the structure of compounds at the molecular level using two different physical
96 processes (Byrne, Sockalingum, & Stone, 2011).

97 In recent years, infrared spectroscopy has been demonstrated to be a very effective tool
98 in the analysis of wood. Near infrared (NIR) spectroscopy, coupled with chemometric
99 data analysis techniques, has emerged as a powerful technique for the screening of
100 different chemical and physical wood parameters, without the need for time consuming
101 analysis. In this sense, near infrared spectroscopy has been successful in developing
102 calibration models for estimating total and extractable phenolic content in oak wood
103 (Baca-Bocanegra, Nogales-Bueno, Hernandez-Hierro, & Heredia, 2018; Giordanengo,
104 Charpentier, Boizot, Roussel, Roger, Chaix, et al., 2009; Zahri, Moubarik, Charrier,
105 Chaix, Bailleres, Nepveu, et al., 2008). However, NIR spectra contains information
106 arising from overtones and combinations of fundamental vibrations which result in
107 broad and unresolved bands that make it difficult to interpret the relationship between
108 cell wall composition and phenolic compound extractability. By comparison, mid IR
109 spectra, commonly measured in the Fourier transform (FT) mode, present sharp and
110 narrow peaks, essentially related to fundamental molecular vibrational frequencies
111 which can be easily assigned to chemical structures (Bokobza, 1998).

112 The potential of FTIR spectroscopy in order to elucidate structural and compositional
113 information of cell wall of wood has been widely investigated in different fields (Chen,
114 Ferrari, Angiuli, Yao, Raspi, & Bramanti, 2010; Jaaskelainen, Nuopponen, Axelsson,
115 Tenhunen, Loija, & Vuorinen, 2003; Traore, Kaal, & Cortizas, 2016).

116 Raman spectroscopy similarly provides a chemical fingerprint of the sample, based on
117 the inelastic scattering of light, by vibrations, and has also been employed to study cell
118 wall structure of wood. An interesting area of Raman application is the identification of
119 wood species and wood origin (Edwards, de Oliveira, & Nesbitt, 2003; Gerasimov,
120 Gurovich, Kostrin, Selivanov, Simon, Stuchekov, et al., 2016). Moreover, hard and
121 softwoods have been differentiated by FT-Raman and FTIR spectroscopy (Evans,
122 1991). Raman imaging spectroscopy has been used to elucidate the spatial distribution
123 of wood constituents, especially the cellulose and lignin (Colares, Pastore, Coradin,
124 Camargos, Moreira, Rubim, et al., 2015; Sun, Simmons, & Singh, 2011).

125 Notably, however, although both mid infrared and Raman spectroscopy have proven to
126 be useful and reliable techniques for the study of the cell wall structure in wood, they
127 have not yet been applied to study the relationship between cell wall composition and
128 phenolic compounds extractability in wood. In the oenological field, they have been
129 jointly employed to look at extractability from grape skins and seeds (Nogales-Bueno,
130 Baca-Bocanegra, Rooney, Hernandez-Hierro, Byrne, & Heredia, 2017; Nogales-Bueno,
131 Baca-Bocanegra, Rooney, Miguel Hernandez-Hierro, Jose Heredia, & Byrne, 2017).

132 In the present study the extractability of phenolic compounds has been determined for
133 oak wood samples, selected based in an initial near infrared reflection screening
134 protocol (unpublished results) and the structural composition of these samples has been
135 evaluated using Raman and attenuated total reflectance Fourier transform infrared
136 (ATR-FTIR). The main aim of this study is to evaluate the relationship between the
137 extractability of phenolic compounds from oak wood and the presence of certain
138 chemical structures or families of compounds in the cellular material of these samples.
139 To support this aim, the ATR FT-IR spectral images of the samples were also recorded
140 and scanning electron microscopy (SEM) techniques were also used. The

141 aforementioned information could assist not only in selecting oak wood suited for
142 improving wine quality through the addition of external copigments to wine, but also
143 in deeply understanding the phenolic extraction process from wood to wine.

144 **2. Material and methods**

145 *2.1. Samples*

146 American non-toasted oak (*Quercus alba* L.) shavings, provided by Tonelería Salas S.L.
147 (Bollullos Par del Condado, Huelva, Spain), were collected for this study, as previously
148 reported Baca-Bocanegra, Nogales-Bueno, Hernandez-Hierro, and Heredia (2018).
149 Briefly, raw wood samples were obtained by processes of sawing the staves in the
150 longitudinal and transversal direction of the fibers. Therefore, two groups of samples
151 were obtained, a longitudinal set and a transversal one. Samples were collected
152 periodically, between June of 2015 and January of 2016. In all, two hundred samples
153 were collected (150 longitudinal and 50 transversal). Upon receipt, the samples were
154 sieved and subjected to a near infrared spectral analysis. After that, wood shavings were
155 placed in stoppered plastic bags and stored in a dry place until use.

156 *2.2. Sample selection*

157 Wood shaving samples were screened using 2 mm and 10 mm mesh sieves placed in
158 tandem. Only shavings of each sample that were retained between them were taken into
159 account in the assay. Then spectral reflectance data of the samples was recorded over
160 the spectral range between 908 and 1676 nm. Six replicate spectra were recorded for
161 each sample and the average of the replication spectra was calculated. The procedure
162 was repeated for each sample and the obtained spectra were combined into the spectral
163 matrix. Afterwards, an unsupervised pattern recognition technique, principal component
164 analysis (PCA), was used to select representative samples from the spectral data set in
165 order to reduce the number of samples maintaining as much spectral variety as possible.

166 Taking into account five principal components, more than ninety-five per cent of the
167 spectral variability of the original spectral matrix was explained. Mahalanobis distances
168 (H) for each sample were calculated and samples were grouped according to a
169 neighborhood H criterion ($NH \leq 0.6$). So, 18 groups with different spectral
170 characteristics were created and one sample from every group was selected. These 18
171 selected samples were used in all the subsequent analyses.

172 *2.3. Total phenol extractability determination*

173 A model wine extraction and an exhaustive extraction were carried out in order to
174 determine the extractability of total phenols for selected wood samples. For model wine
175 extraction, wood samples were immersed in a model wine hydroalcoholic solution (4 g
176 L⁻¹ tartaric acid, 12.5% ethanol, adjusted at pH 3.6 with NaOH 0.5 M) for a maceration
177 period of 72 h at room temperature and without agitation. Oak wood shavings were
178 added to the wine-like solution in a 4 g L⁻¹ ratio. Then, supernatants were used in order
179 to obtain extractable total phenolic content. Afterwards, wood samples were freeze-
180 dried and macerated in methanol: water 50:50 (v/v) during 24 h in order to obtain an
181 exhaustive extraction of phenolic compounds. Total phenolic content was obtained by
182 the analysis of the model wine and exhaustive supernatants. Total phenol contents were
183 determined using the Folin–Ciocalteu method (Singleton & Rossi, 1965). Two hundred
184 and fifty microliters of exhaustive or model wine extractions were mixed with 3.75 mL
185 of sodium carbonate (20 % w/v), 1.25 mL of Folin reagent and made up to 25 mL with
186 ultrapure water. The analyses were performed on an Agilent 8453 UV–visible
187 spectrophotometer (Palo Alto, USA), equipped with diode array detection (DAD),
188 measuring absorbance at 765 nm. Then, extractabilities of each sample were evaluated
189 as the fractions of total phenols extracted by the model wine solution with respect to the

190 exhaustive extraction. Finally, wood samples were sorted according to their phenolic
191 extractability levels expressed as percentages.

192 As a by-product of model wine and exhaustive extractions, non-extracted material
193 (NEM) was obtained from each wood selected sample. These NEM samples were
194 freeze-dried and then stored in a desiccator until further use. Control (without extraction
195 process) and NEM selected samples were used in the subsequent analysis. From here on
196 in, the term “wood samples” will be used to refer to the control samples. Non-extracted
197 material will be specified by the acronym, NEM.

198 *2.4. ATR-FTIR data collection*

199 IR absorption measurements were carried out using a Perkin Elmer Spotlight 400N
200 FTIR imaging system. The data have been collected using both the ATR mode and
201 Micro ATR imaging mode. A liquid nitrogen cooled mercury cadmium telluride (MCT-
202 A) line detector was used.

203 *2.4.1. Data collection using the ATR mode*

204 ATR spectra were recorded using the Perkin Elmer Spotlight 400N Universal
205 Attenuated Total Reflectance (UATR) accessory of the spectrometer, which employs a
206 9-bounce diamond top-plate for this analysis. Spectral data were the result of 8 scans,
207 with a spectral resolution of 4 cm^{-1} and covering the spectral range between 650 and
208 4000 cm^{-1} . All samples were measured with a force gauge of 250 units. 6 absorption
209 spectra were collected for each sample. Prior to recording, a background spectrum was
210 also recorded in the absence of any sample and automatically subtracted by the
211 software.

212

213

214 *2.4.2. Data collection using the Micro ATR imaging mode*

215 ATR images were recorded with the Perkin Elmer Spotlight 400N ATR imaging
216 adapter using a germanium crystal objective of dimensions $\sim 600 \mu\text{m} \times 600 \mu\text{m}$ placed
217 in direct contact with the sample. Spectral images were acquired covering the spectral
218 range between 750 and 4000 cm^{-1} with a pixel size of $6.25 \mu\text{m} \times 6.25 \mu\text{m}$, with 4 scan
219 per pixel at a spectral resolution of 8 cm^{-1} . Background measurement was acquired
220 without sample and without contact between the crystal and the support. ATR images
221 were acquired across a $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ region of the ATR crystal. The ATR crystal
222 was gently placed in contact with the sample using pressure to ensure good contact.

223 *2.5. Raman data collection*

224 A Horiba Jobin-Yvon LabRAM HR800 spectrometer with an external 300 mW diode
225 laser operating at 785 nm as source was used throughout this work. For the
226 measurements, a $\times 50$ objective (MPlanN, Olympus) was employed, providing a spatial
227 resolution of $\sim 1 \mu\text{m}$ at the sample. The confocal hole was set at $100 \mu\text{m}$, the specified
228 setting for confocal operation. The system was spectrally calibrated to the 520.7 cm^{-1}
229 spectral line of silicon. The LabRAM system is a confocal spectrometer that contains
230 two interchangeable gratings (300 and 900 lines per mm respectively). In the following
231 experiments, the 300 lines per mm grating was used, providing a spectral dispersion of
232 approximately 1.5 cm^{-1} per pixel. The detector used was a 16-bit dynamic range Peltier
233 cooled CCD detector. All spectra were recorded over the spectral range between 200
234 and 3600 cm^{-1} and with a spectral resolution of ~ 0.9 to 1.6 cm^{-1} . Six spectra were
235 collected for each sample.

236 *2.6. Scanning electron microscopy*

237 Scanning electron microscopy (SEM) analysis was performed to analyse surface
238 topography and porosity using a Hitachi SU 6600 Fe-SEM instrument. Samples were

239 placed on conductive carbon tabs before being placed in the sample chamber. An
240 accelerating voltage of 2 kV, working distance of 30 mm, condenser lens of 21.0 and
241 current of 20 μ A was used for all samples.

242 *2.7. Data analysis*

243 Samples were sorted into three groups, low, medium and high phenolic extractability
244 levels according to the reference values previously calculated. Wood spectra contain
245 contributions from the chemical content of the sample and physical effects. Therefore,
246 the interpretation of the results obtained from Raman and FTIR spectroscopy requires
247 the pretreatment of the data. A multiplicative scatter correction (MSC) was applied to
248 the ATR-FTIR raw spectra in order to remove the scattering effects. Win ISI (v1.50)
249 (Infrasoft International, LLC, Port. Matilda, PA, USA, 2000) software was used for this
250 aim. ATR-FTIR images were normalised to adjust for point-to-point variations in
251 absorbance and allow the comparison between samples using the *SpectrumIMAGE*
252 software. Baseline correction was applied to Raman raw data. This correction was
253 carried out using MATLAB R2017b (The Mathworks, Natick, MA, USA, 2017) and
254 following the algorithm previously described (Mazet, Carteret, Brie, Idier, & Humbert,
255 2005). Asymmetric truncated quadratic was the cost function, which gives the best
256 results to estimate background in Raman spectra of wood samples, and the backgrounds
257 were estimated by a 5th-order polynomial and with thresholds of 0.01.

258 **3. Results and discussion**

259 *3.1. Total phenol extractability levels*

260 According to their total phenol extractability levels, wood samples were sorted into
261 three different groups, designated as low, medium and high extractability levels and
262 defined by mean \pm standard deviations total extractability expressed as percentages
263 ($62.01 \pm 3.19\%$; $70.29 \pm 2.80\%$; $80.02 \pm 1.97\%$). Thus, 4, 6 and 8 samples were sorted

264 respectively as low, medium and high extractability samples. Moreover, samples
265 belonging to low extractability level are distributed as 1:3 in longitudinal: transversal
266 set, medium extractability samples as 2:4 and high extractability samples as 7:1. It can
267 be seen that most of the samples sorted into the low extractability level have been
268 obtained by shaving the staves in the transversal direction of the fibers while most of the
269 high extractability samples have been obtained by shaving the staves in the longitudinal
270 direction of the fibers (Table S1).

271 3.2. ATR-FTIR data

272 3.2.1. ATR mode

273 A typical ATR - FTIR spectrum of raw oak wood is depicted in Fig. S1. Despite the
274 background correction procedure, a negative baseline was consistently returned for all
275 samples in the region $\sim 3500\text{-}4000\text{cm}^{-1}$, perhaps due to a refractive index matching
276 between the sample and crystal in this region. FTIR spectra are characteristic of the
277 chemical composition of the samples and their peaks can be tentatively assigned to
278 specific molecular bonds or functional groups. A hydrogen bonded (O-H) stretching
279 absorption at $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ (1) and a C-H stretching absorption around 2900 cm^{-1} (2)
280 are observed. The region between 1800 and 600 cm^{-1} , known as the IR fingerprint
281 region, is the region that provides information relevant to molecular structure by means
282 of many well-defined peaks. In wood spectra, the following peaks could be observed:
283 (3) unconjugated groups in lignin and carboxylic acid ester hemicellulose at 1730 cm^{-1} ;
284 (4 and 5) aromatic skeletal vibration in lignin and phenols at $1594/1505\text{ cm}^{-1}$; (6 and 7)
285 C-H deformation in lignin and carbohydrates at $1455/1422\text{ cm}^{-1}$; (8) C-H deformation in
286 cellulose and hemicellulose, C-H bending vibration in cellulose and hemicellulose at
287 1371 cm^{-1} ; (9) C-H vibration in cellulose and C-O vibration in syringyl derivatives at
288 1319 cm^{-1} ; (10) syringyl ring and C-O stretch in lignin and xylan and 1235 cm^{-1} ; (11) C-

289 O-C vibration in cellulose and hemicellulose at 1155 cm^{-1} ; (12) aromatic skeletal, C-C
290 stretch and O-H association band in cellulose, hemicellulose and phenols at 1108 cm^{-1} ;
291 (13) C-O vibration in cellulose and hemicellulose at 1050 cm^{-1} ; (14) C-H deformation in
292 cellulose at 892 cm^{-1} . These peaks have been assigned in accordance with available
293 literature (Faix, 1992; Karim, Daryaei, Torkaman, Oladi, Ghanbary, & Bari, 2016;
294 Pandey & Pitman, 2003; Pandey & Theagarajan, 1997; Schultz & Glasser, 1986). A
295 summary of peak assignments can be found in Table 1.

296 Fig. 1a,b shows the raw average spectra, in the region from $600\text{ to }4000\text{ cm}^{-1}$, of wood
297 samples designated as (a) low, medium and high extractability (including all
298 longitudinal and transverse samples) and (b) as belonging to the longitudinal or
299 transversal set. In both cases, the different spectra have the same pattern, although with
300 different absorbance intensities in some wavelength regions. MSC spectral pretreatment
301 was then applied to the ATR-FTIR spectra and average spectra were calculated for each
302 wood sample. Afterwards, PCA was applied to this spectral matrix. Using all spectral
303 samples, eight principal components were taken into account and 98.57% of the spectral
304 variability of the original spectral matrix was explained. Mahalanobis distances for each
305 sample were calculated. The samples were ranked, in this eight-dimensional space,
306 according to their Mahalanobis distances (H) and the $H > 3$ criterion was applied in
307 order to look for spectral outliers. No H-outliers were found. Fig. 1c,d shows the scatter
308 plots of the wood samples in the space defined by the first and second principal
309 components, which described 57.70% (PC1) and 21.50% (PC2) of the variability in the
310 data, respectively. In Fig. 1c, the samples are represented by a color code according to
311 the different levels of extractability. As the figure shows, high and low extractability
312 samples are separated according to PC2, while medium extractability samples overlap
313 the low and high extractability ones. In Fig. 1d, the samples have been represented in

314 order to find differences between samples obtained by a cut of the staves in the
315 longitudinal or transversal direction of the fibers. The two samples sets are largely
316 differentiated by PC2.

317 Fig. 2 shows the PC2 loadings and the MSC pre-treated average spectra of wood
318 samples with low and high extractabilities. Although the loading of PC2 indicates a
319 significant baseline contribution, specific spectral features are indicated which may
320 influence the wood phenolic extractability. Positive features, ascribed to the high
321 phenolic content samples, can be seen in the 1500-1800 cm^{-1} and 2700-3000 cm^{-1}
322 spectral areas, while negative features, ascribed to the low extractability samples, are
323 observed in the region 1000-1100 cm^{-1} . These features are mainly ascribed to phenolic
324 compounds and lignin (positive features); cellulose and hemicellulose (negative
325 features) (Table 1). Therefore, it may be inferred that high extractability samples are
326 rich in lignin and phenolic compounds, while low extractability samples are rich in
327 polysaccharides. Despite the obvious fact that the phenolic compounds content
328 influences the phenolic extractability, the results indicate that phenolic extractability is
329 also influenced by the structure of the wood itself, (i.e. by the ease with which the
330 phenolic compounds can be released from the wood to the medium). This observation is
331 supported by the fact that most of the high extractability samples have been obtained by
332 sawing the staves in the longitudinal direction of the fibers, while low extractability
333 samples belong to the transversal set, as can be seen in Table S1. Longitudinal and
334 transversal samples may present the same chemical composition, but differ significantly
335 in structural aspects.

336 3.2.2. *ATR Imaging mode*

337 In order to confirm and consolidate the above findings, micro ATR images of the wood
338 samples were registered, over the spectral range between 750 and 4000 cm^{-1} . After

339 integration of the whole data set, the spectral data were normalized and specific
340 wavenumber ranges of all the spectra were selected using the instrument software. The
341 loadings of the second principal components previously obtained in the PCA of ATR-
342 FTIR data were used for wavelength region selection, because this principal component
343 was responsible for the separation of the samples according to the extractability levels
344 (high and low). The wavenumbers corresponding to higher loadings of this particular
345 principal component were selected as candidates for optimum visualization of structural
346 variations. Based on the results obtained in the previous section, wavenumber regions
347 ascribed to polysaccharides (cellulose, hemicellulose $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$) and lignin (1500-
348 1800 cm^{-1} and $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$) were selected as spectral regions that might influence
349 the wood phenolic extractability and therefore are considered in ATR-FTIR images for
350 interpretation purposes. Fig. S2 shows an example of the distribution of the absorbance,
351 integrated over the selected wavenumber ranges, of samples with low and high
352 extractability levels, as a false color image. In general, the absorbance levels for all
353 samples was variable, as indicated by the spread of data points for the samples in Fig. 1
354 c,d. Considering the distribution of cellulose/hemicellulose in the mapped area (Fig. S2
355 a and d), it can be observed that, in general, polysaccharides are present in almost all
356 mapped regions, with the exception of a small region in the high extractability sample.
357 This region could be related to structures such as vessels or cellular lumens in high
358 extractability samples as a consequence of the different cutting direction of the staves to
359 obtain the two sample sets. The spectral ranges of $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ and $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$
360 are ascribed to, a combination of lignin and phenolic compounds, and lignin alone,
361 respectively. For both, high and low extractability samples, the spectral distributions of
362 these regions follow a similar pattern, although the $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ absorbances are
363 higher in Figure S2 b and e. Consistent with literature (Colares, et al., 2015; Sun,

364 Simmons, & Singh, 2011), the spatial profile of spectral bands associated with lignin
365 (Fig. S2 b, c, e, f) indicate a lower proportion of this compound than polysaccharides in
366 the samples. Areas of higher lignin content seem to belong to the characteristic fibers
367 and rays of wood, structures which are richer in lignin (Colares, et al., 2015; Colares, et
368 al., 2016).

369 It is notable that, for all high extractability samples mapped, the regions of maximum
370 absorbance in the spectral range of cellulose/hemicellulose ($1000-1100\text{ cm}^{-1}$) do not
371 coincide with those of maximum absorbance of lignin/phenolics ($1500-1800\text{ cm}^{-1}$ and
372 $2700-3000\text{ cm}^{-1}$). In contrast, for the low extractability samples, the regions of high
373 absorbance of all spectral ranges are co-incident.

374 The difference in structural distributions of the constituent components corroborates the
375 proposal that not only the chemical content, but also the structure of the wood samples
376 play a significant role in determining the phenolic extractability.

377 3.2.3. ATR-FTIR NEM

378 ATR FTIR spectra and images of non-extracted material (NEM) were also recorded and
379 the data were processed following the same procedure used to analyze the control
380 samples. Fig. 3a shows the scores of the NEM samples in the space defined by the two
381 first principal components. It can be seen that, after the extraction of the phenolic
382 compounds, it is still possible to observe some degree of separation between low and
383 high extractability samples according to the second principal component. These results
384 support the influence of the wood cell wall structure on the extraction of phenolic
385 compounds. Loadings of PC2 and the MSC pre-treated average spectra of NEM
386 samples with low and high extractabilities are represented in Fig. 3b. As in the case of
387 the control samples, peaks ascribed to lignin are strong (negative) in high extractability
388 samples, while those ascribed to cellulose/hemicellulose are prominent (positive) for

389 low extractability samples. It can be seen that the feature related to phenolic compounds
390 which can be seen around 1150 cm^{-1} in the PC2 loading of the control samples, is
391 significantly reduced in the PC2 loadings of the samples obtained after the extraction of
392 the phenolic compounds (NEM samples).

393 The spectral region of PC2 loadings that show high variations, related to lignin and
394 polysaccharides ($1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ and $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$) were selected
395 for ATR FTIR image processing. Similar to the case of the control samples, a high
396 degree of inter-sample variation of absorbance levels is observed. Notably, however, in
397 the high extractability samples, a high degree of correlation of the three wavenumber
398 regions is observed, as shown for one example in Fig. S3. In the NEM samples,
399 phenolic compounds have been extracted and thus the absorbance of $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$
400 and $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ spectral areas are practically identical.

401 *3.3. Raman data*

402 In order to confirm and/or complement the findings obtained using ATR-FTIR, Raman
403 spectra of wood samples were collected. Six samples were randomly selected, taking
404 care to select from different extractability levels and quite noisy spectra with several
405 peaks were obtained. Fig. 4a shows a typical wood spectrum after the baseline
406 correction. This spectrum shows characteristic Raman peaks for polysaccharides, lignin
407 and phenolic compounds (Agarwal, 2014; Agarwal, McSweeney, & Ralph, 2011;
408 Colares, et al., 2015; Jason & Emily, 2012; Larsen & Barsberg, 2010). The cellulose-
409 related peaks in the Raman spectra are at 895 , 1098 , 1125 and 1330 cm^{-1} . In detail,
410 cellulose HCC and HCO bending at 895 cm^{-1} , cellulose CC and CO stretch at 1098 cm^{-1} ,
411 cellulose CC and CO stretch; HCC and HCO bend at 1125 cm^{-1} , cellulose HCC and
412 HCO bend at 1330 cm^{-1} . The feature at 1605 cm^{-1} is reported to be associated with an
413 aromatic skeletal vibration of lignin and phenolic compounds. This band presents a

414 strong Raman intensity, whereas it is only weakly active in infrared spectroscopy. The
415 large intensity of this peak is in agreement with the presence of phenolic compounds in
416 the samples. One last peak related to lignin C = C stretch can be appreciated at 1632 cm⁻¹.
417 ¹.

418 To further examine the results, PCA was performed. Fig. 4bc shows the scores of the
419 wood samples in the space defined by the first and second principal components, which
420 described 63.28% (PC1) and 15.60% (PC2) of the variability in the data. Following the
421 same procedure as in ATR FTIR data, in the plot 6b the color code indicates different
422 extractability levels of the samples while in the plot 6c it indicates different cutting
423 direction. As in ATR-FTIR results, a slight degree of separation between high and low
424 extractability samples is indicated, in this case according to PC1. However, in this case
425 medium extractability samples are overlapped with those of low extractability.
426 Regarding the cutting direction, the second principal component provides valuable
427 information, with transversal samples having higher scores than longitudinal ones (Fig.
428 4c). Therefore, Raman spectroscopy enables confirmation of the linkage between cell
429 wall components and phenolic extractability in wood samples.

430 *3.4. Scanning electron microscopy*

431 After analysis by ATR-FTIR and Raman spectroscopy, wood samples of high and low
432 extractability levels were visualized by scanning electron microscopy (SEM) in order to
433 obtain a more complete understanding about their ultrastructure (Fig. 5). Micrographs
434 show morphological differences between the structure of these two groups of samples
435 that could be related to the different phenolic extractability levels. According to what
436 can be seen in the images, samples of high extractability have more cavities (cell
437 lumens, intercellular spaces) in view. This behavior could be probably explained by the
438 different cuts to which the staves have been subjected to obtain the samples

439 (longitudinal and transversal). In this sense, has to be taken into consideration that most
440 of the high extractability samples belong to the longitudinal set, while the transversal set
441 consists mainly of low extractability samples, as can be seen in Table S1. Taking into
442 account that compounds constituting the extractable fraction, and therefore phenolic
443 compounds, can be mixed with the polymers in the cell wall and also as inclusions in
444 the cell lumens, the processing of the staves in the longitudinal direction of the staves
445 could facilitate the transfer of phenolic compounds from wood to the medium.

446 **4. Conclusion**

447 ATR-FTIR and Raman spectroscopic techniques provided complementary information
448 about the composition and structure of wood and have been shown to be useful to relate
449 the more important spectral features to phenolic extractability levels of wood samples.

450 ATR-FTIR data analysis confirmed that wood phenolic extractability is influenced by
451 the cell wall composition (cellulose, hemicellulose and lignin). ATR FTIR image
452 spectroscopy has been successfully used to investigate the distribution of lignin and
453 cellulose/hemicellulose. In general, the observed distributions for polysaccharides and
454 lignin are in agreement with the data reported in the literature and confirm that the
455 structure of the wood samples play a significant role in determining the phenolic
456 extractability. The results originally obtained from the infrared spectra and image have
457 been confirmed by Raman spectroscopy. Moreover, scanning electron microscopy
458 provided valuable complementary information that supports the relationship between
459 the structure of the wood and phenolic extractability levels.

460 The results obtained in this work will allow a greater versatility and efficiency for the
461 decision-making in the winemaking process on the adequacy and/or dosage of wood
462 according to the requirements of the wine and, therefore, it will help to implementing
463 the production of high quality red wines.

464 **Acknowledgements**

465 This work was supported by the Spanish MINECO [AGL2017-84793-C2] and
466 Universidad de Sevilla [VPPI-II.2, VPPI-II.4, VIPPI-EEBB-PIF 2017]. The authors
467 thank the technical staff of Biology Service [Servicios Generales de Investigación
468 (SGI), Universidad de Sevilla]. They also thank Tonelería Salas S.L. (Bollulos Par del
469 Condado, Huelva, Spain) for supplying the cooperage byproduct samples.

470 **Conflict of interest**

471 The authors declare no potential conflict of interest.

REFERENCES

- 472
473
474 Agarwal, U. P. (2014). 1064 nm FT-Raman spectroscopy for investigations of plant cell
475 walls and other biomass materials. *Frontiers in Plant Science*, 5, 490.
- 476 Agarwal, U. P., McSweeney, J. D., & Ralph, S. A. (2011). FT-Raman Investigation of
477 Milled-Wood Lignins: Softwood, Hardwood, and Chemically Modified Black
478 Spruce Lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 31(4), 324-344.
- 479 Baca-Bocanegra, B., Nogales-Bueno, J., Hernandez-Hierro, J. M., & Heredia, F. J.
480 (2018). Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage
481 byproduct by near infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 244, 206-
482 212.
- 483 Bautista-Ortín, A. B., Lencina, A. G., Cano-López, M., Pardo-Mínguez, F., López-
484 Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). The use of oak chips during the ageing
485 of a red wine in stainless steel tanks or used barrels: effect of the contact time
486 and size of the oak chips on aroma compounds. *Australian Journal of Grape and
487 Wine Research*, 14(2), 63-70.
- 488 Bokobza, L. (1998). Near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared
489 Spectroscopy*, 6(1), 3-17.
- 490 Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red
491 wines. A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-
492 87.
- 493 Byrne, H. J., Ostrowska, M. K., Nawaz, H., Dorney, J., Meade, D. A., Bonnier, F., &
494 Lyng, M. F. (2014). Vibrational Spectroscopy: Disease Diagnostics and Beyond.
495 In M. Baranska (Ed.), *Optical Spectroscopy and Computational Methods in
496 Biology and Medicine*, (pp. 355-399). Dordrecht, Netherlands: Springer
497 Netherlands.

498 Byrne, H. J., Sockalingum, G. D., & Stone, N. (2011). Chapter 4 Raman Microscopy:
499 Complement or Competitor? In *Biomedical Applications of Synchrotron*
500 *Infrared Microspectroscopy: A Practical Approach*, (pp. 105-143). Karlsruhe,
501 Germany: The Royal Society of Chemistry.

502 Colares, C. J. G., Pastore, T. C. M., Coradin, V. T. R., Camargos, J. A. A., Moreira, A.
503 C. O., Rubim, J. C., & Braga, J. W. B. (2015). Exploratory Analysis of the
504 Distribution of Lignin and Cellulose in Woods by Raman Imaging and
505 Chemometrics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(6), 1297-1305.

506 Colares, C. J. G., Pastore, T. C. M., Coradin, V. T. R., Marques, L. F., Moreira, A. C.
507 O., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., & Braga, J. W. B. (2016). Near infrared
508 hyperspectral imaging and MCR-ALS applied for mapping chemical
509 composition of the wood specie *Swietenia Macrophylla* King (Mahogany) at
510 microscopic level. *Microchemical Journal*, 124, 356-363.

511 Chen, H., Ferrari, C., Angiuli, M., Yao, J., Raspi, C., & Bramanti, E. (2010). Qualitative
512 and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared
513 spectroscopy and multivariate analysis. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 772-778.

514 Del Álamo Sanza, M., & Nevares Domínguez, I. (2006). Wine aging in bottle from
515 artificial systems (staves and chips) and oak woods. *Analytica Chimica Acta*,
516 563(1-2), 255-263.

517 Edwards, H. G. M., de Oliveira, L. F. C., & Nesbitt, M. (2003). Fourier-transform
518 Raman characterization of brazilwood trees and substitutes. *Analyst*, 128(1), 82-
519 87.

520 Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R. E., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic*
521 *degradation of wood and wood components*. Berlin: Springer.

522 Evans, P. A. (1991). Differentiating hard from soft woods using fourier-transform
523 infrared and fourier-transform raman-spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part a*,
524 47(9-10), 1441-1447.

525 Faix, O. (1992). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In S. Y. Lin & C. W. Dence
526 (Eds.), *Methods in Lignin Chemistry*, (pp. 83-109). Berlin: Springer

527 Fernández de Simón, B., Cadahía, E., del Álamo, M., & Nevares, I. (2010). Effect of
528 size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and
529 in a red wine treated with them. *Anal Chim Acta*, 660(1-2), 211-220.

530 Frangipane, M. T., Santis, D. D., & Ceccarelli, A. (2007). Influence of oak woods of
531 different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using
532 oak chips. *Food Chemistry*, 103(1), 46-54.

533 Gerasimov, V. A., Gurovich, A. M., Kostrin, D. K., Selivanov, L. M., Simon, V. A.,
534 Stuchenkov, A. B., Paltcev, A. V., Uhov, A. A., & Iop. (2016). Raman
535 spectroscopy for identification of wood species. In *3rd International School and*
536 *Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures*,
537 vol. 741).

538 Giordanengo, T., Charpentier, J. P., Boizot, N., Roussel, S., Roger, J. M., Chaix, G.,
539 Robin, C., & Mourey, N. (2009). Oakscan: procédé de mesure rapide et non
540 destructif des polyphénols du bois de chêne de tonnellerie. *Revue française*
541 *d'Oenologie*, 10-15.

542 Gordillo, B., Rodriguez-Pulido, F. J., Mateus, N., Escudero-Gilete, M. L., Gonzalez-
543 Miret, M. L., Heredia, F. J., & de Freitas, V. (2012). Application of LC-MS and
544 tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the
545 Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region. *Analytica*
546 *Chimica Acta*, 732, 162-171.

547 Gordillo, B., Baca-Bocanegra, B., Rodriguez-Pulido, F. J., Lourdes Gonzalez-Miret, M.,
548 Garcia Estevez, I., Quijada-Morin, N., Heredia, F. J., & Teresa Escribano-
549 Bailon, M. (2016). Optimisation of an oak chips-grape mix maceration process.
550 Influence of chip dose and maceration time. *Food Chemistry*, 206, 249-259.

551 Jaaskelainen, A. S., Nuopponen, M., Axelsson, P., Tenhunen, M., Loija, M., &
552 Vuorinen, T. (2003). Determination of lignin distribution in pulps by FTIR ATR
553 spectroscopy. *Journal of Pulp and Paper Science*, 29(10), 328-331.

554 Jason, S. L., & Emily, A. S. (2012). Characterization of Woody and Herbaceous
555 Biomasses Lignin Composition with 1064 nm Dispersive Multichannel Raman
556 Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 66(8), 903-910.

557 Karim, M., Daryaei, M. G., Torkaman, J., Oladi, R., Ghanbary, M. A. T., & Bari, E.
558 (2016). In vivo investigation of chemical alteration in oak wood decayed by
559 *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 127-
560 132.

561 Larsen, K. L., & Barsberg, S. (2010). Theoretical and Raman Spectroscopic Studies of
562 Phenolic Lignin Model Monomers. *The Journal of Physical Chemistry B*,
563 114(23), 8009-8021.

564 Masson, G., Moutounet, M., & Puech, J. L. (1995). Ellagitannin content of oak wood as
565 a function of species and of sampling position in the tree. *American Journal of*
566 *Enology and Viticulture*, 46(2), 262-268.

567 Mazet, V., Carteret, C., Brie, D., Idier, J., & Humbert, B. (2005). Background removal
568 from spectra by designing and minimising a non-quadratic cost function.
569 *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 76(2), 121-133.

570 Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality
571 and production. *Food Research International*, 43(7), 1844-1855.

572 Mori, K., Sugaya, S., & Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in
573 grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia*
574 *Horticulturae*, 105(3), 319-330.

575 Morrell, J. J., & Gartner, B. L. (1998). *Wood as a material*. London: Bruce, A. &
576 Palfreyman, J.W. .

577 Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Hernandez-Hierro, J. M., Byrne,
578 H. J., & Heredia, F. J. (2017). Study of phenolic extractability in grape seeds by
579 means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 232, 602-609.

580 Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Miguel Hernandez-Hierro, J., Jose
581 Heredia, F., & Byrne, H. J. (2017). Linking ATR-FTIR and Raman features to
582 phenolic extractability and other attributes in grape skin. *Talanta*, 167, 44-50.

583 Pandey, K. K., & Pitman, A. J. (2003). FTIR studies of the changes in wood chemistry
584 following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International*
585 *Biodeterioration & Biodegradation*, 52(3), 151-160.

586 Pandey, K. K., & Theagarajan, K. S. (1997). Analysis of wood surfaces and ground
587 wood by diffuse reflectance (DRIFT) and photoacoustic (PAS) Fourier
588 transform infrared spectroscopic techniques. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 55(6),
589 383-390.

590 Schultz, T. P., & Glasser, W. G. (1986). Quantitative structural analysis of lignin by
591 diffuse reflectance Fourier transform spectrometry. *Holzforschung*, 40(SUPPL.),
592 37-44.

593 Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with
594 Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of*
595 *Enology and Viticulture*(16), 144-158.

596 Sun, L., Simmons, B. A., & Singh, S. (2011). Understanding Tissue Specific
597 Compositions of Bioenergy Feedstocks Through Hyperspectral Raman Imaging.
598 *Biotechnology and Bioengineering*, 108(2), 286-295.

599 Traore, M., Kaal, J., & Cortizas, A. M. (2016). Application of FTIR spectroscopy to the
600 characterization of archeological wood. *Spectrochimica Acta Part a*, 153, 63-70.

601 Zahri, S., Moubarik, A., Charrier, F., Chaix, G., Bailleres, H., Nepveu, G., & Charrier,
602 B. (2008). Quantitative assessment of total phenol contents of European oak
603 (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) by diffuse reflectance NIR spectroscopy on
604 solid wood surfaces. *Holzforschung*, 62(6), 679-687.

605

606

607 **Fig. captions¹**

608 **Fig. 1.** Raw average spectra of wood samples with low, medium and high
609 extractabilities (a) and belonging to longitudinal and transversal set (b) in the region
610 from 600 to 4000 cm^{-1} . Score plot of the first two principal components obtained in the
611 PCA performed on ATR-FTIR spectra recorded from wood samples. The individual
612 data points have been color coded according to the phenolic extractability levels (c) and
613 according to the cut direction of the staves (longitudinal and transversal) (d).

614 **Fig. 2.** PC2 loading plot and average MSC pre-treated ATR-FTIR spectra for low and
615 high phenolic extractability wood samples.

616 **Fig. 3.** Score plot of NEM samples in the space defined by PC1 and PC2 codified
617 according to the phenolic extractability levels (a). PC2 loading plot and average MSC
618 pre-treated ATR-FTIR spectra for low and high phenolic extractability NEM samples
619 (b).

620 **Fig. 4.** Baseline corrected Raman spectrum for a wood sample in the region from 200-
621 4000 cm^{-1} and 600-1800 cm^{-1} (a). Score plot of the first two principal components
622 obtained in the PCA performed on Raman spectra recorded from wood samples. The
623 individual data points have been color coded according to the phenolic extractability
624 levels (b) and according to the cut direction of the staves (longitudinal and transversal)
625 (c).

626 **Fig. 5.** Scanning electron microscopy (SEM) of wood samples with high (a) and low (b)
627 extractability levels.

628

629 1 NOTE: All figures should be in color on the Web and in black-and-white in print.

630

Table 1. Main functional groups assigned to the different vibrations present in the ATR-FTIR spectra of wood samples.

Absorption bands (cm ⁻¹)	Assignment ^a	Component	Peak reference (Figure S1)
3300	$\nu(\text{O-H})$	Polysaccharides, lignin	1
2900	$\nu(\text{CH}_2)$	Lignin	2
1730	$\nu(\text{C=O})_{\text{ester}}$	Lignin, hemicellulose	3
1594	$\nu(\text{C-C})_{\text{aromatic}}$	Lignin, phenolics	4
1505	$\nu(\text{C-C})_{\text{aromatic}}$	Lignin, phenolics	5
1455	$\delta(\text{C-H})$	Lignin, polysaccharides	6
1422	$\delta(\text{C-H})$	Lignin, polysaccharides	7
1371	$\delta(\text{C-H})$	Cellulose, hemicellulose	8
1319	$\nu(\text{C-H})$ and $\nu(\text{C-O})$	Cellulose, Syringil derivates	9
1235	$\nu(\text{C-O})$	Lignin, xylan	10
1155	$\nu(\text{C-O-C})$	Cellulose, hemicellulose	11
1108	$\nu(\text{C-C})_{\text{aromatic}}$, $\delta(\text{O-H})$	Cellulose, hemicellulose, phenolics	12
1050	$\nu(\text{C-O})$	Cellulose, hemicellulose	13
892	$\delta(\text{C-H})$	Cellulose	14

^aAssignment: ν , stretching; δ , bending;

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

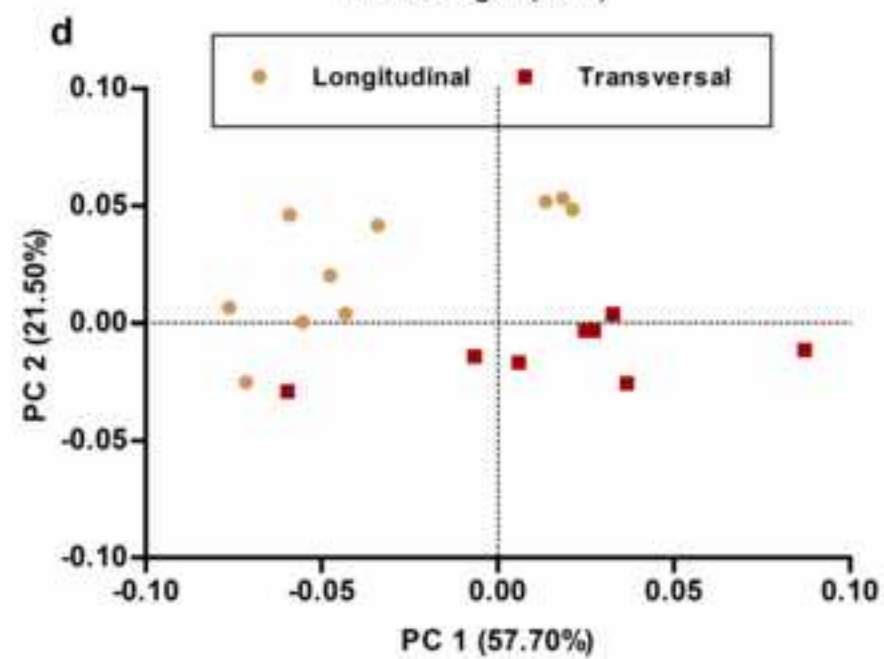
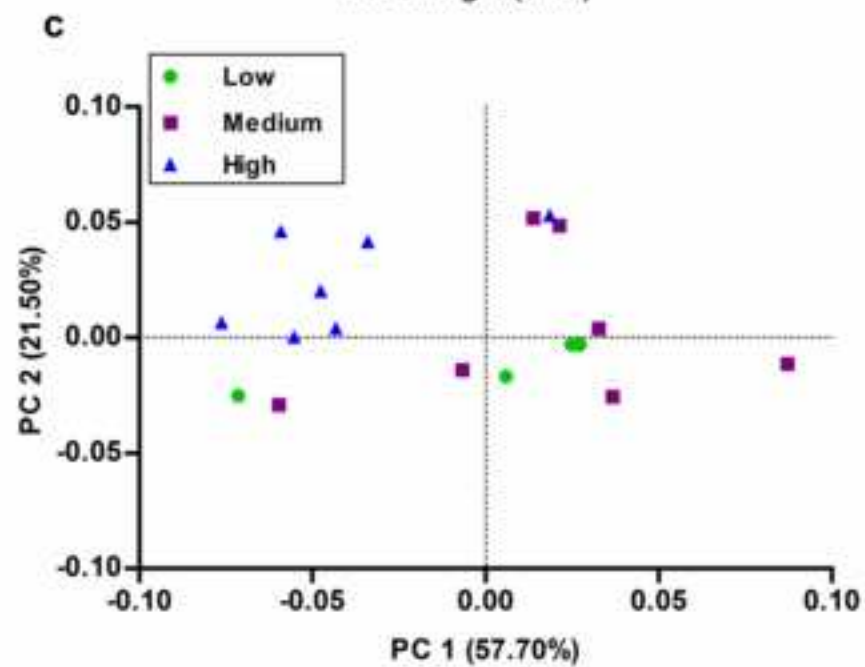
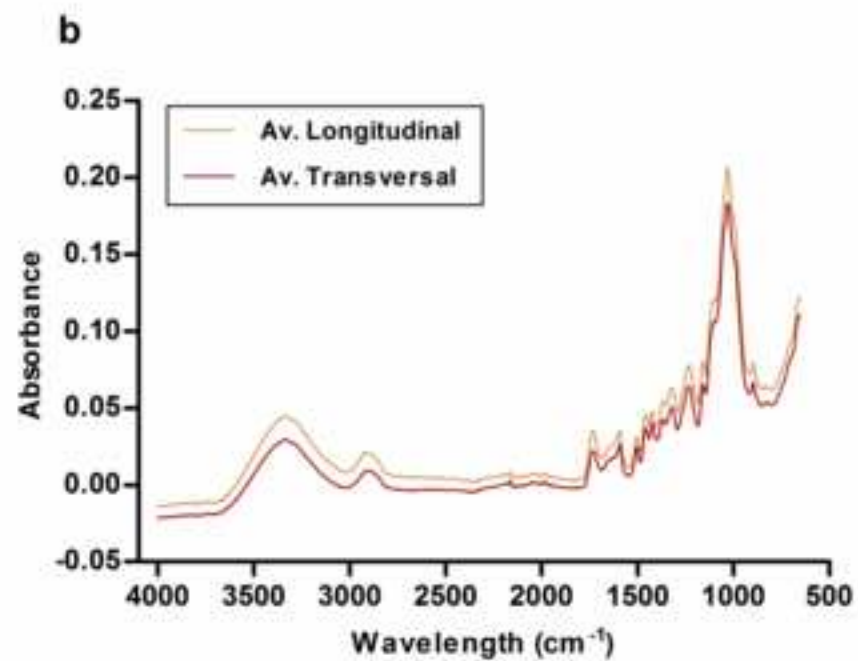
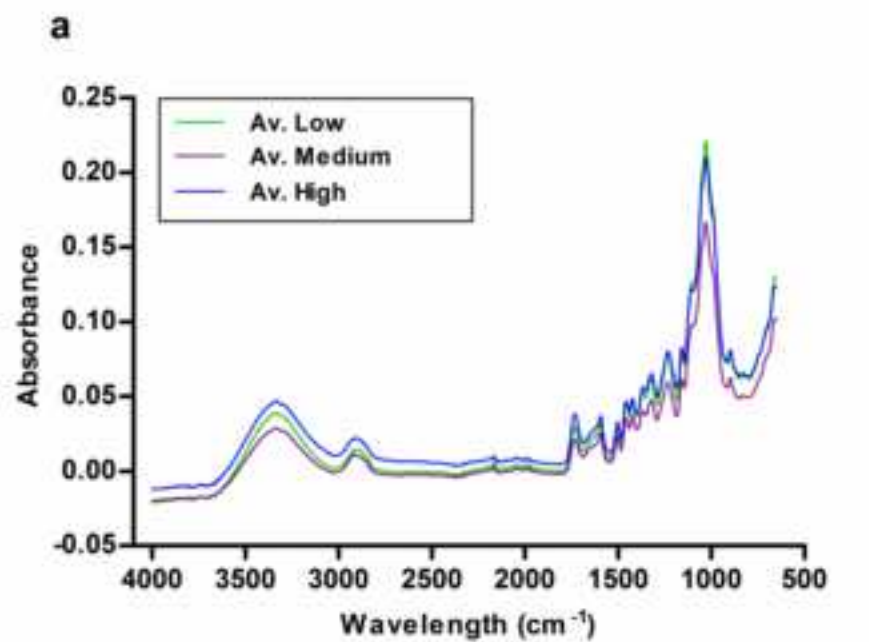


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

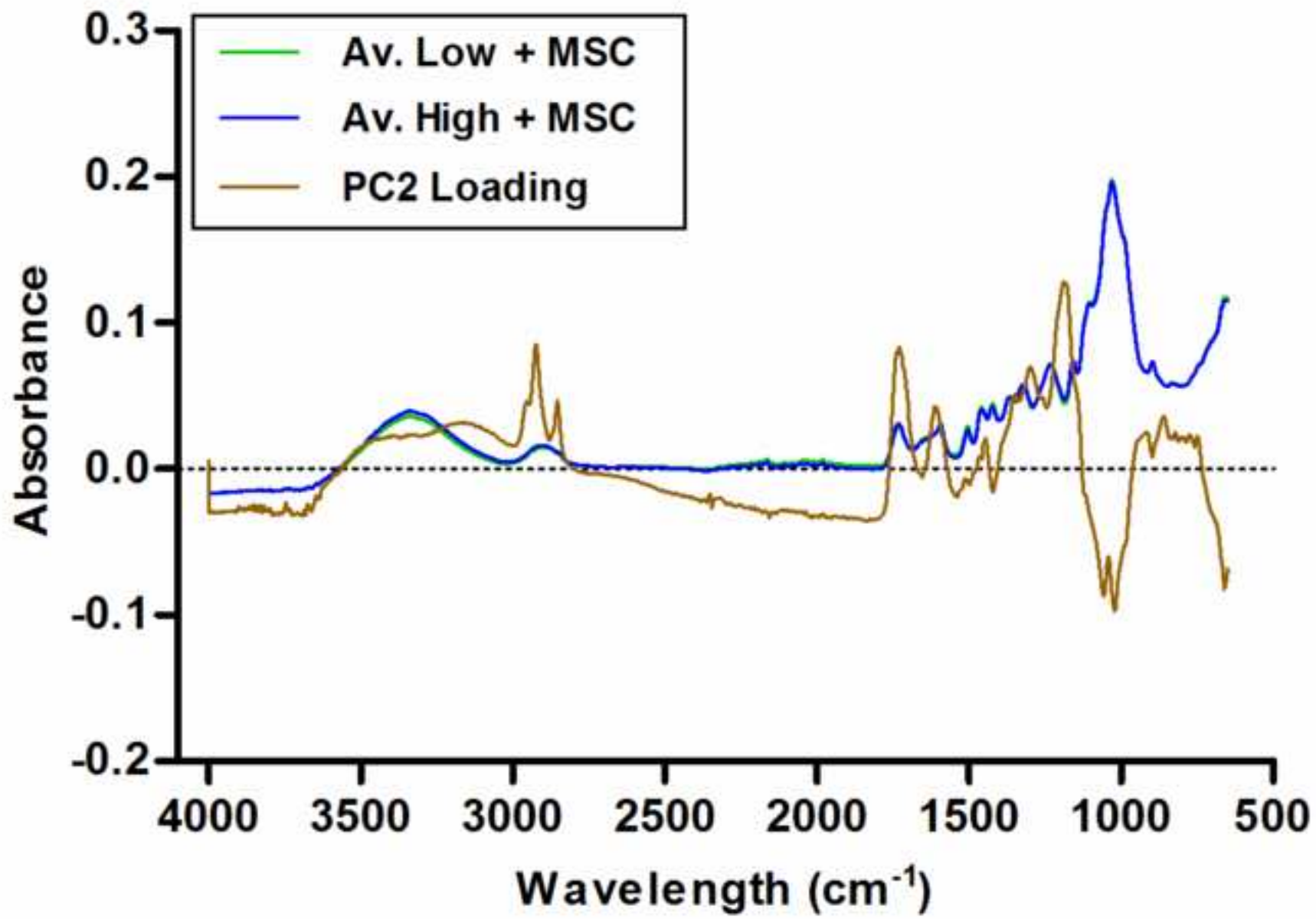


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

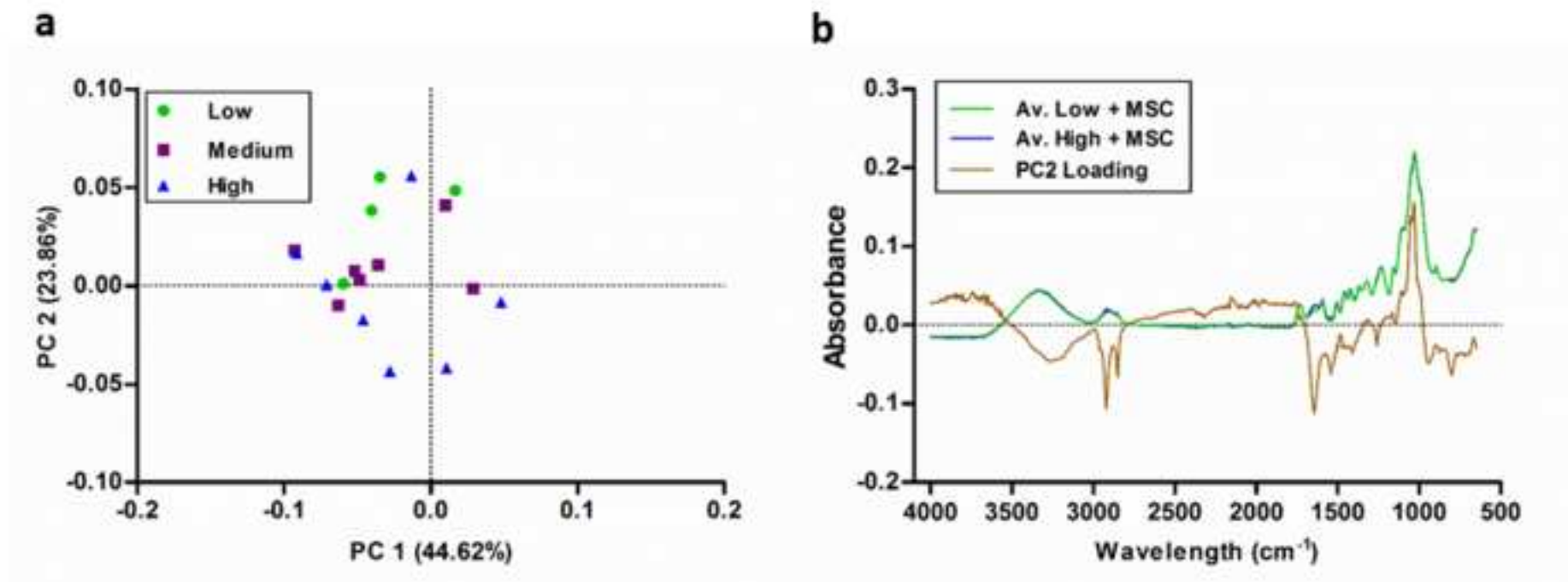


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

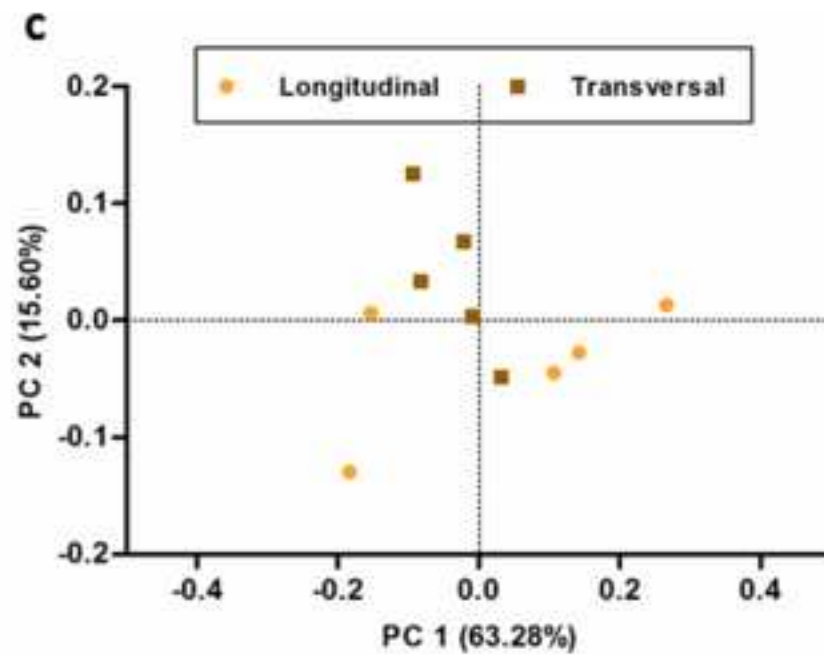
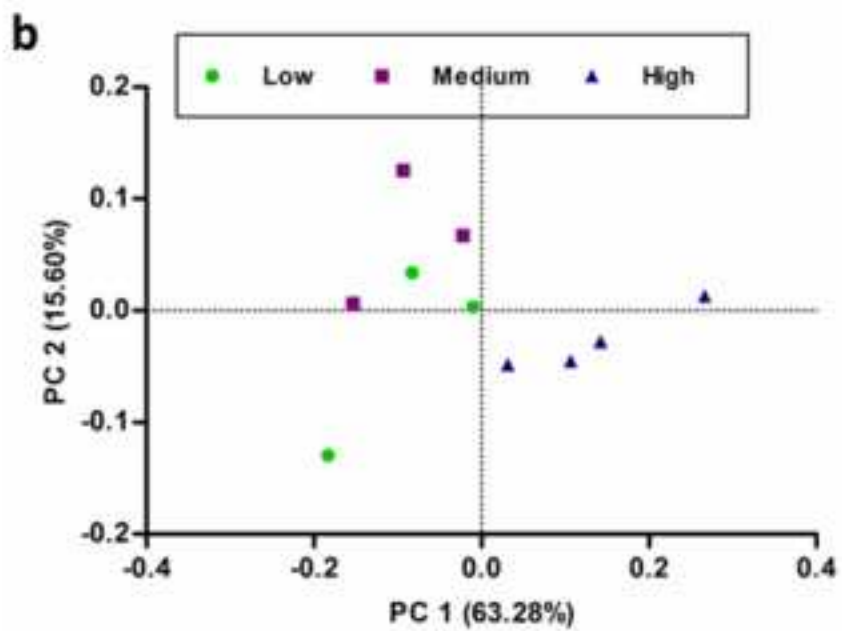
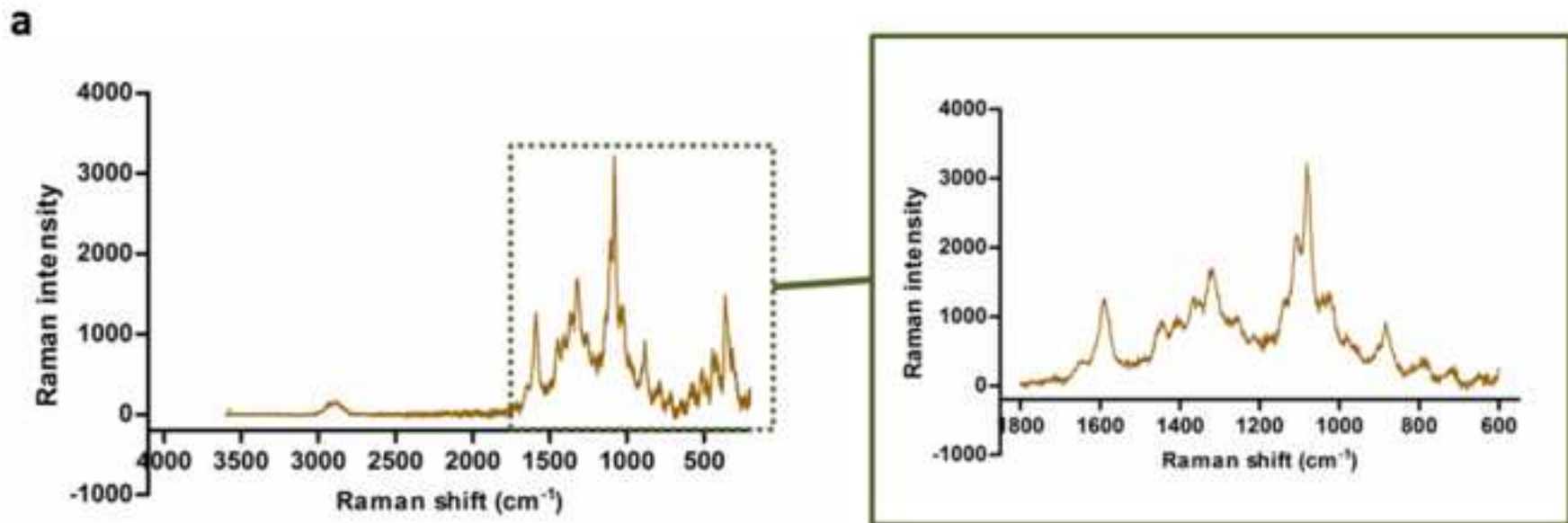
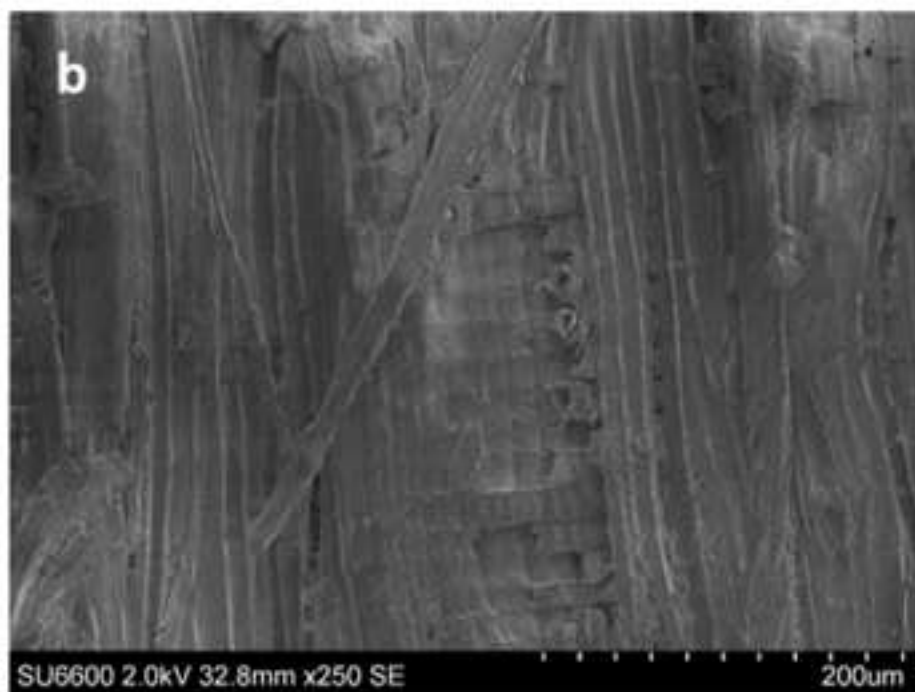
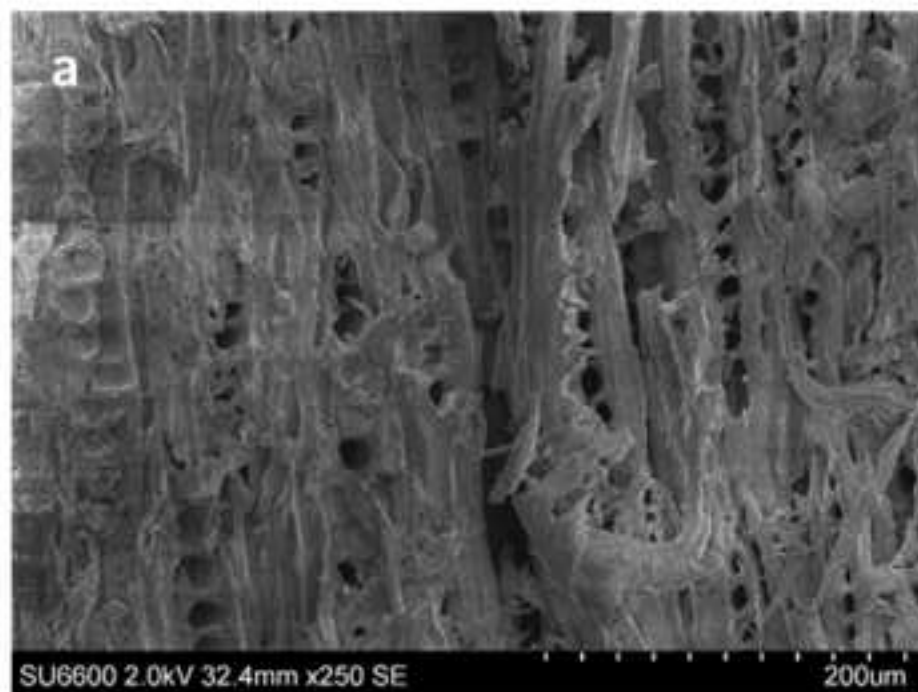


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)



Supplementary Material

[Click here to download Supplementary Material: FTIR_Dublin_B.Baca_Bocanegra_Supplementary material.docx](#)

CAPÍTULO 7: EFECTO DE LA ADICIÓN POST FERMENTATIVA DE VIRUTA DE ROBLE, SUBPRODUCTO DE TONELERÍA, EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y LA CALIDAD CROMÁTICA DE VINOS TINTOS

En: Baca Bocanegra, Berta; Nogales Bueno, Julio; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José: *Valorization of American barrel-shoot wastes: effect of post fermentative addition and readdition on phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines*. Food Chemistry, (en revisión).

1. Antecedentes

La calidad y estabilidad del color del vino tinto está estrechamente relacionada con su composición fenólica, fundamentalmente con los pigmentos antociánicos y otros fenoles extraídos de la uva durante la fase de maceración y también con los procesos de copigmentación en etapas posteriores de la vinificación (Perez-Lamela, Garcia-Falcon, Simal-Gandara, y Orriols-Fernandez, 2007). Los colores pálidos y la presencia de tonalidades no esperadas de acuerdo a la edad del vino, conducen al rechazo del producto por parte del consumidor. Por esta razón, la estabilización del color de los vinos es un importante motivo de preocupación en las bodegas.

En las últimas décadas se han utilizado distintas técnicas de maceración, alternativas a la maceración tradicional, con el objetivo de mejorar la extracción de compuestos fenólicos procedentes de las distintas partes de la uva y lograr la formación de pigmentos nuevos que proporcionan colores más estables. Para alcanzar dicho objetivo se han utilizado técnicas de maceración pre-fermentativa en frío, maceración carbónica y maceración enzimática (Casassa, Bolcato, y Sari, 2015; Cejudo-Bastante, Gordillo, Hernanz, Escudero-Gilete, Gonzalez-Miret, y Heredia, 2014; Gómez-Míguez, et al., 2007; Gonzalez-Neves, Favre, Gil, Ferrer, y Charamelo, 2015; Gonzalez-Neves, Favre, Piccardo, y Gil, 2016; Heredia, et al., 2010; Ortega-Heras, Perez-Magarino, y Gonzalez-Sanjose, 2012).

Entre las posibles estrategias dirigidas a paliar la deficiente madurez fenólica de las uvas y por consiguiente los problemas de estabilidad de color, también se encuentra la adición de copigmentos en la vinificación, bien como extractos, o bien a partir de fuentes naturales que los contengan (Cejudo-Bastante, et al., 2016; Gordillo, et al., 2013; Gordillo, Cejudo-Bastante, Rodríguez-Pulido, Jara-Palacios, Ramírez-Pérez, González-Miret, et al., 2014; Harbertson, Parpinello, Heymann, y Downey, 2012; Rivero, et al., 2017; Soto Vazquez, Rio Segade, y Orriols Fernandez, 2010). La realización de estas prácticas en las etapas iniciales de la vinificación

durante periodos de maceración más prolongados, incrementa los niveles iniciales de copigmentación (aumenta la relación copigmento/pigmento), lo que conduce a la formación de pigmentos derivados más estables.

En este contexto, la adición post-fermentativa de virutas crudas de roble se puede considerar una estrategia interesante. La madera es una importante fuente de compuestos fenólicos que podrían participar directa o indirectamente en la estabilización de los pigmentos extraídos de la uva, tanto porque mejoran la proporción de copigmento/pigmento como porque evitan la degradación de los antocianos gracias al efecto protector frente a la oxidación que ejercen los elagitaninos. La utilización de subproductos de tonelería como coadyuvantes en vinificación implica, además, la reutilización y aprovechamiento de desechos industriales y aporta sostenibilidad al proceso lo que se traduce en importantes beneficios económicos y ambientales para la industria del vino.

2. Objetivo

El objetivo general de este trabajo es la evaluación del potencial de la viruta cruda de roble americano, subproducto de tonelería, como coadyuvante de vinificación. Para ello, se estudia la influencia de la adición post-fermentativa de virutas crudas de roble, en la composición fenólica y la calidad cromática de vinos tintos de variedad Syrah elaborados en zonas de clima cálido.

3. Parte experimental

Para este ensayo se elaboraron vinos a partir de uva tinta *Vitis vinifera* L. de variedad Syrah, cultivada en un viñedo de la región del Condado de Huelva, correspondiente a la campaña de vendimia 2016. Se utilizaron 900 kg de uva cosechada con madurez tecnológica óptima (14 Bé). Los vinos fueron elaborados en la bodega experimental que el grupo de investigación tiene en la Bodega “Cooperativa Nuestra Sra. Del Socorro” en Rociana del Condado (Huelva), siguiendo el método tradicional de vinificación en tinto.

Para su elaboración, la masa de vendimia (uvas despalladas y trituradas) se distribuyó en seis tanques de 220 litros de capacidad donde se desarrolló la fermentación alcohólica con la adición de levadura seleccionada *Saccharomyces cerevisiae* (VINIFERM BY, 25 g hL⁻¹, Agrovin, Ciudad Real, Spain). Durante la fase de fermentación alcohólica (6 días) se hicieron bazuqueos una vez al día. Pasado este tiempo, los vinos fueron descubados a nueve depósitos de acero inoxidable de 50 litros de capacidad para llevar a cabo tres tratamientos experimentales post-fermentativos, por triplicado:

- Vinos elaborados por vinificación tradicional (sin adición post-fermentativa), como vino de control (3 depósitos), CW.
- Vinos con 30 días de maceración post-fermentativa con virutas crudas de roble americano, subproducto de tonelería, agregando 12 g L⁻¹ de virutas (3 depósitos). De ahora en adelante “adición simple”, SW.
- Vinos con doble maceración post-fermentativa: adición de 12 g L⁻¹ de virutas (30 días) y una segunda adición de 12 g L⁻¹ de virutas (30 días) una vez eliminada la primera adición (3 depósitos). De ahora en adelante “adición doble”, DW.

Simultáneamente a la adición de virutas, se inocularon bacterias de ácido láctico *Oenococcus oeni* para estimular el desarrollo de la fermentación maloláctica. Los vinos se mantuvieron en tanques de acero inoxidable hasta el final de la maceración post-fermentativa y durante el proceso de estabilización. La elaboración del vino fue cuidadosamente seguida analizando muestras de forma periódica para la determinación de parámetros enológicos de control.

La viruta de madera utilizada en este ensayo fue generada en un único punto del proceso de elaboración de las barricas, (cepillado de la madera en dirección longitudinal de las fibras, C) y en una única fecha. En la fecha elegida, se recolectaron 10 kg de virutas, cantidad suficiente para dosificar, después del proceso de tamizado, en una proporción de 12 g viruta por cada litro de vino. Una vez recogida y tamizada, la muestra fue caracterizada por análisis de imagen hiperespectral a partir del modelo desarrollado por B. Baca-Bocanegra, et al. (2018) en el Capítulo 3 de esta memoria, que permite estimar el contenido fenólico extraíble en viruta cruda de roble. Debido al tamaño de la muestra y con el fin de considerar la posible heterogeneidad fenólica característica de la madera, la cantidad inicial fue dividida en varias submuestras y se aplicó el modelo a cada una de ellas. La viruta fue dosificada en los distintos depósitos, teniendo en cuenta el contenido fenólico extraíble predicho, de tal forma que este parámetro no suponga un nuevo factor de variabilidad en el ensayo de vinificación.

Para cada vino elaborado, se tomaron muestras en diferentes momentos de la vinificación, antes del embotellado: adición de viruta (0 días), final de la maceración (30 días para la adición simple y 60 para la adición doble) y final de la fase de estabilización antes del embotellado (120 días). Para cada muestra se determinó el perfil antociánico, contenido de fenoles totales, contenido de flavanoles totales, parámetros colorimétricos, diferencias de color, porcentajes de copigmentación y polimerización de antocianos.

La determinación de antocianos se realizó mediante análisis cromatográfico, siguiendo una modificación del método descrito por M. García-Marino, et al. (2010) como se describe en Hernández-Hierro, et al. (2013). Para la determinación de flavanoles se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Vivas, et al. (1994), el cual mide la reacción entre el reactivo 4-

(dimetilamino)cinamaldehído (DMACA) y los compuestos flavanólicos de la muestra, mientras que la determinación de los fenoles totales presentes en los extractos se utilizó el también método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton, et al., 1965).

La determinación de los parámetros de color se llevó a cabo por espectrofotometría UV-Vis. Se registraron los espectros visibles (380-780 nm) de cada muestra con un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-Vis (Palo Alto, EE. UU.), utilizando cubetas de vidrio de 2 mm de paso de luz y agua destilada como blanco de referencia. Los parámetros de color CIELAB (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} y h_{ab}) se calcularon a partir de los espectros de transmitancia utilizando el software original CromaLab® (Heredia, et al., 2004). Las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) se han calculado como la distancia euclídea entre dos puntos en el espacio tridimensional definido por L^* , a^* y b^* :

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

La contribución de los antocianos copigmentados al color total del vino a pH 3.6 (% de antocianos copigmentados) y el grado de polimerización de antocianos (porcentaje de pigmentos poliméricos) se determinarán siguiendo el método propuesto por (Boulton, 1996). La acidez de las muestras de vino se ajustó previamente a un valor de pH de 3.6 usando NaOH 1M o HCl de la misma molaridad en dicho ajuste.

Se aplicó el ANOVA para estudiar la influencia de la adición post-fermentativa de viruta de roble sobre la composición fenólica y la calidad cromática de los vinos. Se utilizaron como variables dependientes los diferentes parámetros de referencia calculados y como factor el tratamiento (control, adición simple y adición doble). Los análisis estadísticos se realizaron con el software *Statistica* v.8.0 StatSof Inc®.

La adición de viruta dio lugar a un aumento significativo ($p < 0.05$) del contenido de fenoles totales tanto en SW como en DW, con respecto al vino control, al final del proceso de maceración (30 días para SW y 60 días para DW). Este aumento está relacionado con la cesión, durante la maceración, de compuestos fenólicos de la madera tales como ácidos fenólicos y elagitaninos y, como cabría esperar, es mayor en el caso de la adición doble. Por el contrario, la contribución al contenido de flavanoles es prácticamente despreciable debido a su escasa presencia en la madera. En esta etapa del proceso de vinificación, el contenido de antocianos en SW y DW experimenta una caída con respecto al vino control, muy ligera en el caso de la adición simple y significativa ($p < 0.05$) en el ensayo de adición doble. Este efecto puede estar relacionado con la formación de antocianos poliméricos durante las primeras etapas de la vinificación. Además, la viruta añadida puede adsorber en su superficie los compuestos antociánicos provocando una disminución de su concentración especialmente cuando la cantidad de viruta añadida es elevada y el periodo de maceración largo (Gordillo, et al., 2016). Durante la fase de estabilización, la disminución de antocianos continúa, observándose este efecto en los tres vinos elaborados pero de forma mucho

más acusada en SW y DW, de tal forma que las diferencias entre ellos y el control son significativas ($p < 0.05$). Reacciones de oxidación, hidratación y polimerización están, probablemente, relacionadas con esta disminución de antocianos (Cejudo-Bastante, et al., 2017). De acuerdo con estas observaciones, se obtienen mayores porcentajes de polimerización en los vinos SW y DW (66.81 - 64.16 %) que en el vino control (60%) lo que indica mayores proporciones de antocianos más estables en los vinos macerados con virutas y por tanto más estabilidad química. A pesar de que al final de la fase de maceración existe una diferencia importante en la caída que experimentan los antocianos en DW con respecto a SW, al final de la fase estabilización no existen diferencias significativas para este parámetro entre estos dos vinos, siendo los niveles comparables e incluso ligeramente superior para el ensayo de adición doble. Esta compensación puede estar relacionada con el efecto protector que ejercen los elagitaninos (Cano-Lopez, Lopez-Roca, Pardo-Minguez, y Gomez Plaza, 2010), añadidos en mayor cantidad en el caso de la adición doble de viruta.

En cuanto a las características cromáticas, los vinos SW y DW presentan cromas mayores y valores de tono menores que el control, es decir, vinos con mayor intensidad cromática y tonos rojos más azulados que el control aunque estas diferencias sólo son significativas en el caso del tono. No se aprecian diferencias entre los ensayos y el control con respecto a la claridad. DW presenta mayor valor para el tono, es decir, tonos más rojos anaranjados, que están en concordancia con mayor cantidad de antocianos libres, menos estables y menos porcentaje de polimerización que el ensayo de adición simple. La adición de viruta provoca un efecto positivo no solo en la densidad de color (croma) y el tono sino también en la estabilidad del color, es decir, durante la fase de estabilización, la pérdida de color que experimentan los vinos elaborados añadiendo viruta es menor que en el vino control. Esta pérdida de color es menor en el ensayo de adición simple que en el doble. Las diferencias de color se deben fundamentalmente a diferencias cualitativas (Δh_{ab}) ya que es el único parámetro para el que existen diferencias significativas entre los ensayos y el control. Con el objetivo de comparar las dos adiciones al final de la fase de estabilización se determinaron las diferencias de color entre SW y DW con respecto a CW (SW_{120} vs CW_{120} y DW_{120} vs CW_{120}). La mayor diferencia de color se aprecia en el caso de la adición simple (4.51 frente a 3.76 unidades) aunque estas diferencias entre los ensayos no son significativas. En ambos casos, las diferencias de color con respecto al testigo son apreciables por el ojo humano.

4. Conclusiones

- La adición post-fermentativa de virutas crudas de roble modifica el contenido fenólico, dando lugar a vinos con un contenido de fenoles totales significativamente mayor que los vinos elaborados mediante vinificación tradicional. Se puede considerar, por tanto, una alternativa tecnológica interesante para aumentar la relación copigmento/pigmento.
- En referencia al color, la adición post-fermentativa condujo a vinos con características colorimétricas diferentes a los vinos elaborados por vinificación tradicional, siendo la diferencia visualmente apreciable tanto en la adición simple como en la doble. Concretamente, favoreció la elaboración de vinos con mayor intensidad cromática y tonalidad más azulada. Dichos resultados demostraron la efectividad de la maceración post-fermentativa con viruta de madera, para estabilizar el color de los vinos y provocar modificaciones de color más bajas a lo largo del tiempo, produciendo vinos cromáticamente más estables para un mejor envejecimiento posterior.
- Entre las dos adiciones ensayadas, la adición post fermentativa simple condujo a vinos con color más estable, que mantuvieron sus tonalidades azuladas durante más tiempo. En el caso de la adición doble, la eventual adsorción de los pigmentos sobre las virutas durante la maceración parece tener mayor efecto sobre el color que el incremento de copigmentación y/o polimerización.

Manuscript Number:

Title: Valorization of American barrel-shoot wastes: effect of post fermentative addition and readdition on phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: Anthocyanins; wood; byproducts; colour; wine.

Corresponding Author: Dr. José Miguel Hernández-Hierro,

Corresponding Author's Institution: Universidad de Sevilla

First Author: Berta Baca-Bocanegra

Order of Authors: Berta Baca-Bocanegra; Julio Nogales-Bueno; José Miguel Hernández-Hierro; Francisco José Heredia

Abstract: The influence of post fermentative addition of American barrel-shoot wastes on phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines has been evaluated as an oenological alternative to the conventional winemaking for avoiding the common color loss of red wines elaborated in warm climates. American oak wood byproducts added were previously classified by hyperspectral image analysis according to the amount of phenolic compounds transferred to the extraction media. After that, wines were elaborated under different maceration conditions by applying only one proportion of wood (12 g L⁻¹) and two different maceration procedures.

The simple post-fermentative addition led to wines with a more stable color, which maintained their bluish hues for a longer time. In the case of double addition, the adsorption of the pigments during the maceration seems to have a stronger effect on the colour than copigmentation and polymerization due to the copigments extracted from the wood.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL

Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos

Dr. J. M. Hernández Hierro

E-mail: jmhierro@usal.es

Sevilla, October 29, 2018

Dear Editor,

Please find enclosed our manuscript entitled “Valorization of American barrel-shoot wastes: effect of post fermentative addition and readdition on phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines”, which we would like to submit for your consideration for publication in Food Chemistry.

The influence of the post fermentative addition of American barrel-shoot wastes on the phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines has been evaluated as an oenological alternative to the conventional winemaking for avoiding the common color loss of red wines elaborated in warm climates. American oak wood byproducts added were previously classified by hyperspectral image analysis according to the amount of phenolic compounds transferred to the extraction media. After that, wines were elaborated under different maceration conditions by applying only one proportion of wood (12 g/L) and two different maceration procedures.

The simple post-fermentative addition led to wines with a more stable color, which maintained their bluish hues for a longer time. In the case of double addition, the adsorption of the pigments during the maceration seems to have a stronger effect on the color than copigmentation and polymerization due to the copigments extracted from the wood.

The use of cooperage by-products as source of copigments for wine leads to a sustainable and competitive cooperage industry, through waste reduction and by-product valorization.

I hope that this work will be of interest for your journal.

I look forward to hearing from you.

Yours sincerely,

José Miguel Hernández Hierro

Highlights

- Post fermentative addition of American barrel-shoot has been evaluated.
- Two different maceration conditions were applying.
- Simple addition led to wines with a more stable colour and bluish hues.
- Adsorption of pigments presents a strong effect on colour in double addition.

1 **Valorization of American barrel-shoot wastes: effect of post fermentative addition and**
2 **readdition on phenolic composition and chromatic quality of Syrah red wines.**

3 Berta Baca-Bocanegra¹, Julio Nogales-Bueno¹, José Miguel Hernández-Hierro^{1*}, Francisco
4 José Heredia¹

5

6 ¹ *Food Color and Quality Laboratory, Section of Nutrition and Food Science, Facultad de*
7 *Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain.*

8 Running Title: **Valorization of cooperage byproduct in wine**

9

10 Berta Baca-Bocanegra: bbaca1@us.es

11 Julio Nogales-Bueno: julionogales@us.es

12 José Miguel Hernández-Hierro: jmhhierro@us.es

13 Francisco José Heredia: heredia@us.es

14 *** Corresponding author:**

15 José Miguel Hernández-Hierro

16 Food Colour & Quality Lab., Dept. Nutrition & Food Science. Facultad de Farmacia.

17 Universidad de Sevilla. 41012-Sevilla, Spain

18 Tel.: +34 954556495 Fax: +34 954556110

19 E-mail: jmhhierro@us.es

20

21 **Summary**

22 The influence of post fermentative addition of American barrel-shoot wastes on phenolic
23 composition and chromatic quality of Syrah red wines has been evaluated as an oenological
24 alternative to the conventional winemaking for avoiding the common color loss of red wines
25 elaborated in warm climates. American oak wood byproducts added were previously
26 classified by hyperspectral image analysis according to the amount of phenolic compounds
27 transferred to the extraction media. After that, wines were elaborated under different
28 maceration conditions by applying only one proportion of wood (12 g L^{-1}) and two different
29 maceration procedures.

30 The simple post-fermentative addition led to wines with a more stable color, which
31 maintained their bluish hues for a longer time. In the case of double addition, the adsorption
32 of the pigments during the maceration seems to have a stronger effect on the colour than
33 copigmentation and polymerization due to the copigments extracted from the wood.

34 **Keywords**

35 Anthocyanins; wood; byproducts; colour; wine.

36 **Introduction**

37 Colour is one of the main characteristic defining the quality of wines and usually the first
38 attribute perceived by the consumer, who want to get high quality wines. Phenolic compounds
39 participate in several sensory attributes such as astringency, bitterness and colour. Among
40 them, anthocyanins extracted from grape skin are the principal compounds involved in the
41 colour of red wines and their interactions with other phenolic compounds (i.e. copigments),
42 normally colorless, allow improving the colour stabilization of aged wines by copigmentation
43 reactions (Boulton, 2001a; B. Gordillo, Cejudo-Bastante, Rodriguez-Pulido, Gonzalez-Miret,
44 & Heredia, 2013a). The amount of anthocyanins is influence by a number of factors such as
45 cultivar, growing region, climate, and growth conditions (Downey, Dokoozlian, & Krstic,
46 2006; Ferrer-Gallego, Hernandez-Hierro, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailon, 2012; B.
47 Gordillo, Rodriguez-Pulido, Mateus, Escudero-Gilete, Gonzalez-Miret, Heredia, et al., 2012;
48 Mira de Orduña, 2010; Ryan & Revilla, 2003). Under warm climatic conditions, it is a usual
49 pattern the lack of copigmentation phenomena, which contribute to colour stabilization, and it
50 is hampered by the shortfall of pigments and copigments (Boulton, 2001b). In this scenario, it
51 is desirable to obtain additional polyphenols from others sources that contribute to assist in
52 the copigmentation and hence in color stabilization.

53 Wood from the manufacture of barrels is a natural source of phenols that, used in the initial
54 stages of vinification in red wines, are expected to modify the conditions of the medium and
55 affect their organoleptic characteristics, specifically, the colour. The contribution of wood is
56 expected to improve the stabilization of the wine colour, contributing to the phenomena of
57 copigmentation or preventing the oxidation of colored compounds during winemaking
58 maturation, especially when they are subjected to ageing process (Boulton, 2001b; Ribéreau-
59 Gayon, Dubourdieu, Doneche, Lonvaud, Glories, Maujean, et al., 2006). Although oak wood
60 has been used for centuries for the elaboration of the barrels where the wine is stored during

61 aging, the addition of cooperage byproducts such as oak wood has been recently aimed at
62 implementing the production of high quality red wines in the last years. Taking into account
63 this topic the founded references are scarce. Food industry generates high amounts of solid
64 waste/by-products, which represent a main disposal problem for the industry. The aforesaid
65 by-products are very promising sources of value-added substances, with particular emphasis
66 to the retrieval technologically important secondary metabolites. Over the next few years,
67 food processing waste management might be rapidly expand.

68 Taking into account these considerations, the aim of the present work was to evaluate the
69 influence of post fermentative addition of American barrel-shoot wastes on phenolic
70 composition and chromatic quality of Syrah red wines. This technique was applied as an
71 oenological alternative to the conventional winemaking for avoiding the common colour loss
72 of red wines elaborated in warm climates. Moreover, the added byproducts were previously
73 classified by hyperspectral image analysis according to the amount of phenolic compounds
74 transferred to the extraction media trying to optimize the aforesaid procedure.

75 **Material and methods**

76 *Samples and winemaking*

77 American oak wood byproducts added (Toneleria Salas S.L. (Bollullos Par del Condado,
78 Huelva, Spain)), were previously classified by hyperspectral image analysis according to the
79 amount of phenolic compounds transferred to the extraction media as previously described
80 elsewhere in Baca-Bocanegra *et al.* (2018). After that, red wines were elaborated under
81 different maceration conditions by applying only one proportion of wood (12 g/L) and two
82 different maceration procedures and were compared with a traditionally macerated Syrah red
83 wine.

84 Red wines were made from grapes *Vitis vinifera* L. var. Syrah grown in “Condado de Huelva”
85 Designation of Origin (DO), in the southwest of Spain (warm climate) as previously described

86 in Rivero *et al.* (2019). Briefly, about 900 kg of grapes were harvested in 2016 vintage at
87 optimum technological maturity and in good sanitary conditions. The fermentation mash
88 (destemmed and crushed grapes) was distributed in six stainless steel tanks of 220 L capacity
89 to perform the alcoholic fermentation by adding 25 g hL⁻¹ of selected *Saccharomyces*
90 *cerevisiae* yeast (Viniferm BY, Agrovin, Ciudad Real, Spain). Skin maceration was
91 developed manually punching down each tank once a day during 6 days. After this, the mash
92 was drawn off to remove the solid parts, and the free run wines were racked to nine 50 L
93 stainless steel tanks.

94 The first procedure involves the oak wood maceration for 30 days (SW), in a second strand,
95 oak wood was readded and macerated for 30 additional days (DW). A control wine was also
96 elaborated (CW). Simultaneously to the wood addition (without wood in control wines),
97 selected *Oenococcus oeni* lactic acid bacteria (VINIFERM Oe 104, 14 mL hL⁻¹, Agrovin,
98 Ciudad Real, Spain) were inoculated to develop the malolactic fermentation. At the end of
99 malolactic fermentation, sulfur dioxide levels were adjusted (free sulfur dioxide about 100 mg
100 L⁻¹ in all wines). The wines were kept in the stainless steel tanks during 120 days until the end
101 of the stabilization process. A schematic workflow is provided in **Figure 1**. Three samples
102 were taken into account in this study: initial point: 0 days, addition of wood, wood removal:
103 after 30 days for SW and 60 days for DW and end of stabilization point (120 days).

104 *Phenolic compound analysis*

105 Total phenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu method (Singleton & Rossi,
106 1965). Gallic acid was used as a standard for construction of the calibration curve and the
107 concentration of total phenols was expressed as gallic acid equivalent.

108 Flavanol content was determined following a modification of Vivas *et al.* (1994) using the
109 DMACA (4-dimethylaminocinnamaldehyde) as reagent. A calibration curve of (+)-catechin
110 was used for quantification and results were expressed as (+)-catechin equivalent.

111 Both Folin–Ciocalteu and DMACA analyses were performed on an Agilent 8453 UV–visible
112 spectrophotometer (Palo Alto, USA), equipped with diode array detection (DAD).

113 Anthocyanin content was determined by chromatographic analysis following a modification
114 of the method of García-Marino *et al.* (2010) as described elsewhere in Hernández-Hierro *et*
115 *al.* (2013). Results were expressed as mg of malvidin-3-*O*-glucoside equivalents.

116 *Colour analysis*

117 The visible spectra (380–770 nm) was measured in triplicate at constant intervals ($\Delta\lambda = 2$ nm)
118 with an Agilent 8453 UV–Vis spectrophotometer (Palo Alto, USA), using 2 mm path length
119 glass cells and distilled water as white reference. CIE 1964 10° standard observer and the CIE
120 D_{65} illuminant were used as references to calculate the tristimulus values recommended by the
121 Commission Internationale de l'Éclairage (CIE, 2004). The CIELAB space was used and
122 parameters measured included: Lightness (L^*), red-green coordinate (a^* , $-a^*$), yellow-blue
123 coordinate (b^* , $-b^*$). From a^* and b^* coordinates another two colour parameters are defined:
124 the hue angle (h_{ab}) and chroma (C^*_{ab}) which indicate qualitative and quantitative aspects of
125 colour respectively. Calculations were made using the ChromaLab® software (Heredia,
126 Alvarez, Gonzalez-Miret, & Ramirez, 2004).

127 *Statistical analysis.*

128 Univariate analyses of variance (ANOVA) and Tukey post *hoc test* were applied to look for
129 differences in the obtained mean values for each parameter. The statistically significant level
130 was considered at $\alpha = 0.05$. All statistical analyses were performed using Statistica v.8.0
131 software (StatSoft Inc., OK, USA, 2007).

132 **Results and discussion**

133 *Phenolic compound analysis*

134 At the end of the maceration process (30 days for SW and 60 days for DW) a significant
135 increase ($p < 0.05$) of the content of total phenols is observed both in SW and in DW with

136 respect to their respective control (**Table 1**). This increase is related to the transfer, during the
137 maceration, of wood phenolic compounds such as phenolic acids and ellagitannins. As
138 expected, DW has higher values than SW for this parameter since in this case a double
139 amount of shavings is added during a longer period of maceration (12 g L⁻¹ chip for 30 days
140 and a second addition of 12 g L⁻¹). On the other hand, the contribution of wood to the content
141 of flavanols is practically negligible due to their scarce presence in the wood. Regarding the
142 content of anthocyanins, SW and DW experience a fall in the level of pigments, very slight in
143 the case of the simple and significant addition ($p < 0.05$) in the double addition test. This drop
144 in anthocyanin content is consistent with the results previously obtained by other authors (B.
145 Gordillo, Cejudo-Bastante, Rodriguez-Pulido, Gonzalez-Miret, & Heredia, 2013b). This
146 effect may be related to the formation of polymeric anthocyanins during the early stages of
147 winemaking by condensation reactions between the anthocyanins themselves and other
148 compounds given up by the wood or initially present in the wine as flavanols. In addition, the
149 added wood can adsorb the anthocyanin compounds on its surface causing a decrease in its
150 concentration especially when the amount of added wood is higher and the maceration period
151 is longer (Belen Gordillo, Baca-Bocanegra, Rodriguez-Pulido, Lourdes Gonzalez-Miret,
152 Garcia Estevez, Quijada-Morin, et al., 2016).

153 During the stabilization phase (120 days from the start of the post-fermentative maceration),
154 differences in the phenolic content between the two SW and DW wines tend to be reduced.
155 Total phenols suffer a drop in both SW and DW with respect to CW although these
156 differences are not significant. On the other hand, the falls experienced by the anthocyanins in
157 SW and DW with respect to the control are significant ($p < 0.05$). This typically occurs due to
158 reactions such as oxidation, hydration and polymerization (Cejudo-Bastante, Rivero-
159 Granados, & Heredia, 2017).

160 The percentage of polymerization is higher in the tests than in the control 60.00-66.81% -
161 64.16% for CW-SW-DW respectively. This indicates higher proportions of more stable
162 anthocyanins in the wines macerated with wood and therefore more chemical stability.

163 At the end of the maceration phase there was an important difference in the fall experienced
164 by flavanols and anthocyanins in DW with respect to SW. However, throughout the
165 stabilization phase there are no significant differences for these parameters between SW and
166 DW, the levels being comparable and even slightly higher for the double addition test. This
167 compensation may be related to the protective effect exerted by ellagitannins (Cano-Lopez,
168 Lopez-Roca, Pardo-Minguez, & Gomez Plaza, 2010), added in greater quantity in the case of
169 the double addition of shavings.

170 In the stabilization phase, there is also a significant decrease in the flavanols in SW and DW
171 with respect to the control, probably due to their involvement in the polymerization reactions
172 with anthocyanins (He, Liang, Mu, Pan, Wang, Reeves, et al., 2012; Rentzsch, Schwarz,
173 Winterhalter, & Hermosin-Gutierrez, 2007).

174 *Colour analysis*

175 **Table 2** shows the CIELAB color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) for the different
176 elaborated wines (CW, SW and DW) in three different stages of the winemaking process:
177 addition of the wood (day 0), end of the maceration (day 30 for the simple addition test and
178 day 60 for the double maceration test) and end of the stabilization process (day 120).

179 At the end of the maceration phase, the largest color extraction corresponds to the control
180 wines, which show the lowest values of lightness and hue (L^* and h_{ab}) and the highest chroma
181 values (C^*_{ab}), which it translates into darker wines, with more chromatic intensity and red-
182 blue hues. These results are consistent with the higher content of anthocyanins in the control
183 wines during the maceration period, especially in the double addition test. However, during
184 the stabilization stage, these results are inverted and it is the SW and DW wines that present

185 larger chromatics and smaller hues than the control, that is, wines with greater chromatic
186 intensity and more bluish red hues than the control, although these differences they are only
187 significant in case of hue. There are no differences between the tests and the control with
188 respect to lightness. The double test has a higher hue, ie, redder orange hues, which are in
189 agreement with a larger amount of free anthocyanins, less stable and less percentage of
190 polymerization than the simple addition test.

191 This fact can be observed in the color diagram (**Figure 2**). The different position of the
192 traditionally produced wines and the wines made with the addition of raw wood, at the end of
193 the stabilization phase, make it possible to objectively establish their chromatic
194 characteristics. All the wines are located in the first quadrant (positive values of a and b).
195 However, SW and DW wines have smaller b values that result in wines with higher purple or
196 reddish-blue hues than control wines.

197 In order to evaluate the color stability of each wine, the CIELAB color differences (ΔE^*_{ab})
198 and the differences for the different color parameters (ΔL^* , ΔC^*_{ab} and Δh_{ab}) were calculated
199 for each wine (CW, SW and DW) considering the end point of the stabilization stage with
200 respect to the initial point (day 0, chip addition) (**Table 3**). The addition of raw wood causes a
201 positive effect not only on color density (chroma) and hue but also on color stability. This
202 means that, during the stabilization stage, the loss of color experienced by the wines made by
203 adding wood is less than in the control wine. As expected, this loss of color is less in the
204 simple addition test than in the double test. The color differences are mainly due to qualitative
205 differences (Δh_{ab}) since it is the only parameter for which there are significant differences
206 between the tests and the control; CW, SW and DW experience positive variations of the hue
207 towards redder-orange tones, these differences being smaller in the case of SW. All wines
208 experience losses in the chroma but the differences between them are negligible. With regard

209 to lightness, this parameter increases in the three wines, with SW experiencing a smaller
210 increase although the differences between them are not significant.

211 In order to evaluate the influence of the post-fermentation addition at the end of the
212 stabilization stage, the color differences between SW and DW with respect to CW (SW₁₂₀ vs
213 CW₁₂₀ and DW₁₂₀ vs CW₁₂₀) were determined (**Table 4**). The greatest color difference is seen
214 in the case of the simple addition (4.51 vs. 3.76 units) although these difference between the
215 tests is not significant. Taking into account that ΔE^*_{ab} greater than 3 CIELAB units indicate
216 appreciable differences by the human eye (Martínez, Melgosa, Pérez, Hita, & Negueruela,
217 2001), the color differences caused by the post-fermentative addition of raw wood both
218 simple and re-addition or double are appreciable for the human eye.

219 **Conclusions**

220 The improvement experienced by the wines made by adding oak wood may be related to the
221 transference to the wine of compounds coming from wood, especially ellagitannins. Its
222 presence can favor the formation of new pigments derived from anthocyanins that increase the
223 stability of the color due to an increase in blue hues which in turn leads to a decrease in the
224 yellow hues.

225 It can be concluded that the simple post-fermentative addition of raw American oak wood led
226 to wines with a more stable color, which maintained their bluish hues for a longer time. In the
227 case of double addition, the adsorption of the pigments during the maceration seems to have a
228 stronger effect on the color than copigmentation and polymerization (color stabilization) due
229 to the copigments extracted from the wood.

230 **Acknowledgments**

231 The Spanish Ministerio de Economía y Competitividad is thanked for project AGL2017-
232 84793-C2. Universidad de Sevilla is thanked for B. Baca-Bocanegra predoctoral grant (VPPI-
233 II.2) and J. Nogales-Bueno postdoctoral grant (VPPI-II.4). The authors thank the technical

234 staff of Biology Service [Servicios Generales de Investigación (SGI), Universidad de Sevilla].
235 They also thank Tonelería Salas S.L. (Bollulos Par del Condado, Huelva, Spain) for supplying
236 the cooperage byproduct samples.
237

References

- 238
239
- 240 Baca-Bocanegra, B., Nogales-Bueno, J., Hernández-Hierro, J. M., & Heredia, F. J. (2018). Evaluation
241 of extractable polyphenols released to wine from cooperage byproduct by near infrared
242 hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, *244*, 206-212.
- 243 Boulton, R. (2001a). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wines. A
244 critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(67-87).
- 245 Boulton, R. (2001b). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wines. A
246 critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*, 67-87.
- 247 Cano-Lopez, M., Lopez-Roca, J. M., Pardo-Minguez, F., & Gomez Plaza, E. (2010). Oak barrel
248 maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments
249 and wine colour. *Food Chemistry*, *119*(1), 191-195.
- 250 Cejudo-Bastante, M. J., Rivero-Granados, F. J., & Heredia, F. J. (2017). Improving the color and
251 aging aptitude of Syrah wines in warm climate by wood-grape mix maceration. *European*
252 *Food Research and Technology*, *243*(4), 575-582.
- 253 CIE. (2004). *Colorimetry* (3rd ed.). Vienna, Austria.
- 254 Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., & Krstic, M. P. (2006). Cultural practice and environmental
255 impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research.
256 *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(3), 257-268.
- 257 Ferrer-Gallego, R., Hernandez-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailon, M. T. (2012).
258 Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano.
259 *Anal Chim Acta*, *732*, 73-77.

260 Garcia-Marino, M., Hernandez-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailon, M. T. (2010).
261 Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo
262 and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 134-142.

263 Gordillo, B., Baca-Bocanegra, B., Rodriguez-Pulido, F. J., Lourdes Gonzalez-Miret, M., Garcia
264 Estevez, I., Quijada-Morin, N., Heredia, F. J., & Teresa Escribano-Bailon, M. (2016).
265 Optimisation of an oak chips-grape mix maceration process. Influence of chip dose and
266 maceration time. *Food Chemistry*, 206, 249-259.

267 Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodriguez-Pulido, F. J., Gonzalez-Miret, M. L., & Heredia, F. J.
268 (2013a). Application of the differential colorimetry and polyphenolic profile to the evaluation
269 of the chromatic quality of Tempranillo red wines elaborated in warm climate. Influence of
270 the presence of oak wood chips during fermentation. *Food Chem*, 141(3), 2184-2190.

271 Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodriguez-Pulido, F. J., Gonzalez-Miret, M. L., & Heredia, F. J.
272 (2013b). Application of the differential colorimetry and polyphenolic profile to the evaluation
273 of the chromatic quality of Tempranillo red wines elaborated in warm climate. Influence of
274 the presence of oak wood chips during fermentation. *Food Chemistry*, 141(3), 2184-2190.

275 Gordillo, B., Rodriguez-Pulido, F. J., Mateus, N., Escudero-Gilete, M. L., Gonzalez-Miret, M. L.,
276 Heredia, F. J., & de Freitas, V. (2012). Application of LC-MS and tristimulus colorimetry to
277 assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical
278 warm climate region. *Anal Chim Acta*, 732, 162-171.

279 He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012).
280 Anthocyanins and Their Variation in Red Wines II. Anthocyanin Derived Pigments and Their
281 Color Evolution. *Molecules*, 17(2), 1483-1519.

282 Heredia, F. J., Alvarez, C., Gonzalez-Miret, M. L., & Ramirez, A. (2004). *CromaLab, análisis de*
283 *color, CromaLab, análisis de color* Sevilla, Spain.

284 Hernández-Hierro, J. M., Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F. J., & Heredia, F. J. (2013).
285 Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of
286 anthocyanins in intact grapes during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
287 *61*(41), 9804-9809.

288 Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note. Visual and
289 Instrumental Color Evaluation in Red Wines. *Food Science and Technology International*,
290 *7*(5), 439-444.

291 Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and
292 production. *Food Research International*, *43*(7), 1844-1855.

293 Rentzsch, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., & Hermosin-Gutierrez, I. (2007). Formation of
294 hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: Precursor levels and evolution during
295 aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(12), 4883-4888.

296 Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., Glories, Y., Maujean, A., & Branco,
297 J. M. (2006). *Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications*. West
298 Sussex, England: J. Wiley & Sons.

299 Rivero, F. J., Jara-Palacios, M. J., Gordillo, B., Heredia, F. J., & Gonzalez-Miret, M. L. (2019). Impact
300 of a post-fermentative maceration with overripe seeds on the color stability of red wines. *Food*
301 *Chem*, *272*, 329-336.

302 Ryan, J. M., & Revilla, E. (2003). Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo
303 grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(11),
304 3372-3378.

305 Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-
306 Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*(16), 144-158.

307 Vivas, N., Glories, Y., Lagune, L., Saucier, C., & Augustin, M. (1994). Estimation du degré de
308 polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-
309 diméthylaminocinnamaldéhyde. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 28,
310 319-336.

311

312 **Fig. captions¹**

313 **Fig. 1.** Schematic representation of the wine elaboration process.

314 **Fig.2.** Location of wines at the end of the stabilization phase (120 days) on the CIELAB
315 (a*b*)-diagram.

316

317 1 NOTE: All figures should be in color on the Web and in black-and-white in print.

318

Table 1

Table 1. Polyphenol content (mg L⁻¹) for the different elaborated wines (CW, SW and DW) in three different stages of the winemaking process.

	C30	S30	C60	D60	C120	S120	D120
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Total Phenols	2019.19a ± 36.07	2466.32b ± 218.38	2174.45a ± 157.95	2503.72b ± 119.89	2304.90a ± 292.92	1984.79a ± 221.36	2052.87a ± 165.94
Total Flavanols	141.21a ± 7.24	136.55a ± 8.24	129.11a ± 9.28	102.24b ± 9.31	137.66a ± 16.91	70.43b ± 4.17	88.03b ± 8.87
Total Anthocyanins	150.20a ± 11.12	141.17a ± 4.84	132.44a ± 19.04	68.74b ± 3.49	113.57a ± 40.77	15.77b ± 1.10	23.63b ± 6.70
Total non acylated	67.83a ± 2.00	66.02a ± 3.62	62.99a ± 7.05	35.67b ± 2.15	54.66a ± 18.63	6.85b ± 0.56	11.33b ± 3.50
Total acetyls	46.53a ± 2.34	45.27a ± 0.61	43.50a ± 5.47	24.14b ± 1.28	36.94a ± 12.60	6.70b ± 0.39	9.77b ± 2.44
Total coumaroyls	36.51a ± 7.28	30.55a ± 1.16	26.63a ± 6.64	9.60b ± 0.21	22.64a ± 9.55	2.89b ± 0.35	3.21b ± 0.77
Total acylated	82.71a ± 9.20	75.49a ± 1.40	69.79a ± 12.10	33.41b ± 1.34	59.25a ± 22.14	9.25b ± 0.55	12.64b ± 3.22
Delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	2.90a ± 0.19	2.91a ± 0.13	2.81a ± 0.36	1.61b ± 0.07	2.53a ± 0.68	0.60b ± 0.04	0.78b ± 0.13
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside	5.56a ± 0.15	5.39a ± 0.16	5.20a ± 0.65	3.00b ± 0.12	4.63a ± 1.46	1.00b ± 0.04	1.38b ± 0.28
Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside	5.53a ± 0.88	4.62a ± 0.96	4.50a ± 0.61	2.35b ± 0.10	3.46a ± 1.11	0.52b ± 0.06	0.66b ± 0.13
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	54.85a ± 1.14	54.12a ± 2.43	51.49a ± 5.92	29.72b ± 1.86	45.05a ± 15.38	5.74b ± 0.45	9.53b ± 2.96
Delphinidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)-glucoside	1.56a ± 0.70	1.48a ± 0.72	1.60a ± 0.19	1.18b ± 0.07	1.42a ± 0.30	0.78b ± 0.02	0.83b ± 0.06
Petunidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)-glucoside	2.18a ± 0.25	2.08a ± 0.06	1.84a ± 0.30	1.13b ± 0.04	1.74a ± 0.53	0.72b ± 0.02	0.79b ± 0.09
Peonidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)-glucoside	1.03a ± 0.19	1.06a ± 0.09	1.04a ± 0.25	0.44b ± 0.03	0.83a ± 0.28	0.64b ± 0.02	0.60b ± 0.03
Malvidin-3- <i>O</i> -(6'-acetyl)-glucoside	4.42a ± 0.13	4.61a ± 0.56	4.44a ± 0.31	2.50b ± 0.20	3.65a ± 1.05	0.83b ± 0.04	1.09b ± 0.22
Delphinidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>trans</i>)	38.70a ± 2.63	37.39a ± 0.93	35.93a ± 4.87	20.24b ± 1.03	30.65a ± 10.54	5.08b ± 0.32	7.80b ± 2.13
Malvidin-3- <i>O</i> -(6'-caffeyl)-glucoside (<i>trans</i>)	1.42a ± 0.23	1.11a ± 0.08	0.77a ± 0.39	0.50a ± 0.07	0.70a ± 0.23	0.62a ± 0.02	0.59a ± 0.02
Cyanidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside	1.48a ± 0.16	1.36a ± 0.17	0.95a ± 0.37	0.66a ± 0.18	0.98a ± 0.26	0.37b ± 0.01	0.39b ± 0.02
Petunidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>trans</i>)	3.48a ± 1.28	2.66a ± 0.25	2.07a ± 0.67	0.88b ± 0.22	1.80a ± 0.60	0.41b ± 0.01	0.39b ± 0.01
Malvidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>cis</i>)	2.91a ± 1.88	1.21a ± 0.51	0.96a ± 0.19	0.448b ± 0.04	0.66a ± 0.12	0.65a ± 0.05	0.61a ± 0.07
Peonidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>trans</i>)	2.86a ± 0.05	2.90a ± 0.70	2.98a ± 1.30	1.32b ± 0.09	2.44a ± 0.60	0.56 b ± 0.09	0.56b ± 0.07
Malvidin-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside (<i>trans</i>)	26.05a ± 3.93	23.00a ± 0.41	20.59a ± 3.78	7.47b ± 0.59	17.77a ± 8.29	1.88b ± 0.23	2.37b ± 0.70

Significant differences ($\alpha=0.05$).

Table 2. CIELAB color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) for the different elaborated wines (CW, SW and DW) in three different stages of the winemaking process

Stage		Control	Simple	Double
		Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Initial (0 day)	L^*	74.34 \pm 0.53	74.83 \pm 0.87	73.90 \pm 0.76
	a^*	27.18 \pm 0.80	28.88 \pm 0.88	28.51 \pm 0.55
	b^*	-0.99 \pm 0.25	-1.72 \pm 0.25	-1.68 \pm 0.14
	C^*_{ab}	27.20 \pm 0.79	28.93 \pm 0.89	28.23 \pm 0.54
	h_{ab}	-2.10 \pm 0.57	-3.40 \pm 0.43	-3.53 \pm 0.37
Maceration (30 days)	L^*	79.17a \pm 0.54	83.44b \pm 0.22	
	a^*	19.18a \pm 0.72	15.19b \pm 0.17	
	b^*	2.41a \pm 0.31	3.39b \pm 0.18	
	C^*_{ab}	20.22a \pm 0.61	15.57b \pm 0.13	
	h_{ab}	6.29a \pm 1.36	12.57b \pm 0.77	
Maceration (60 days)	L^*	79.96a \pm 1.24		81.31a \pm 0.45
	a^*	20.25a \pm 0.89		19.49a \pm 0.25
	b^*	1.00a \pm 0.15		1.55b \pm 0.06
	C^*_{ab}	20.77a \pm 0.68		19.55a \pm 0.26
	h_{ab}	2.74a \pm 0.54		4.54b \pm 1.14
Stabilization (120 days)	L^*	80.81a \pm 0.52	80.54a \pm 1.76	80.92a \pm 1.33
	a^*	18.01a \pm 0.63	18.89a \pm 1.17	18.60a \pm 1.35
	b^*	3.91a \pm 0.45	1.50b \pm 0.10	2.14b \pm 0.26
	C^*_{ab}	17.87a \pm 1.32	18.95a \pm 1.17	18.73a \pm 1.35
	h_{ab}	10.94a \pm 0.71	4.55b \pm 0.37	6.59c \pm 0.92

Significant differences ($\alpha=0.05$)

Table 3. Colour differences for each wine (CW, SW and DW) considering the end point of the stabilization with respect to the initial point (day 0, wood addition).

Stage		Control	Simple	Double
		Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Stabilization (120 days)	ΔE^*_{ab}	13.50a \pm 3.20	12.00a \pm 2.65	12.76a \pm 1.90
	ΔL^*	6.47a \pm 0.58	5.71a \pm 2.24	7.02a \pm 1.48
	ΔC_{ab}	-9.99a \pm 3.21	-9.99a \pm 1.90	-9.51a \pm 1.38
	Δh_{ab}	13.04a \pm 1.24	7.94b \pm 0.75	10.12b \pm 1.28

Significant differences ($\alpha=0.05$).

Table 4. Colour differences between SW and DW with respect to CW (SW_{120} vs CW_{120} and DW_{120} vs CW_{120}) at the end of the stabilization stage.

		Post-maceration treatment [*]	
		C	L
Stage		Mean \pm SD	Mean \pm SD
	ΔE^*_{ab}	4.51a \pm 2.69	3.76a \pm 2.56
	ΔL^*	-0.36a \pm 2.08	0.10a \pm 1.14
Global	ΔC_{ab}	2.12a \pm 2.88	1.52a \pm 3.16
	Δh_{ab}	-6.33a \pm 0.51	-4.34b \pm 0.61

Significant differences ($\alpha=0.05$).

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

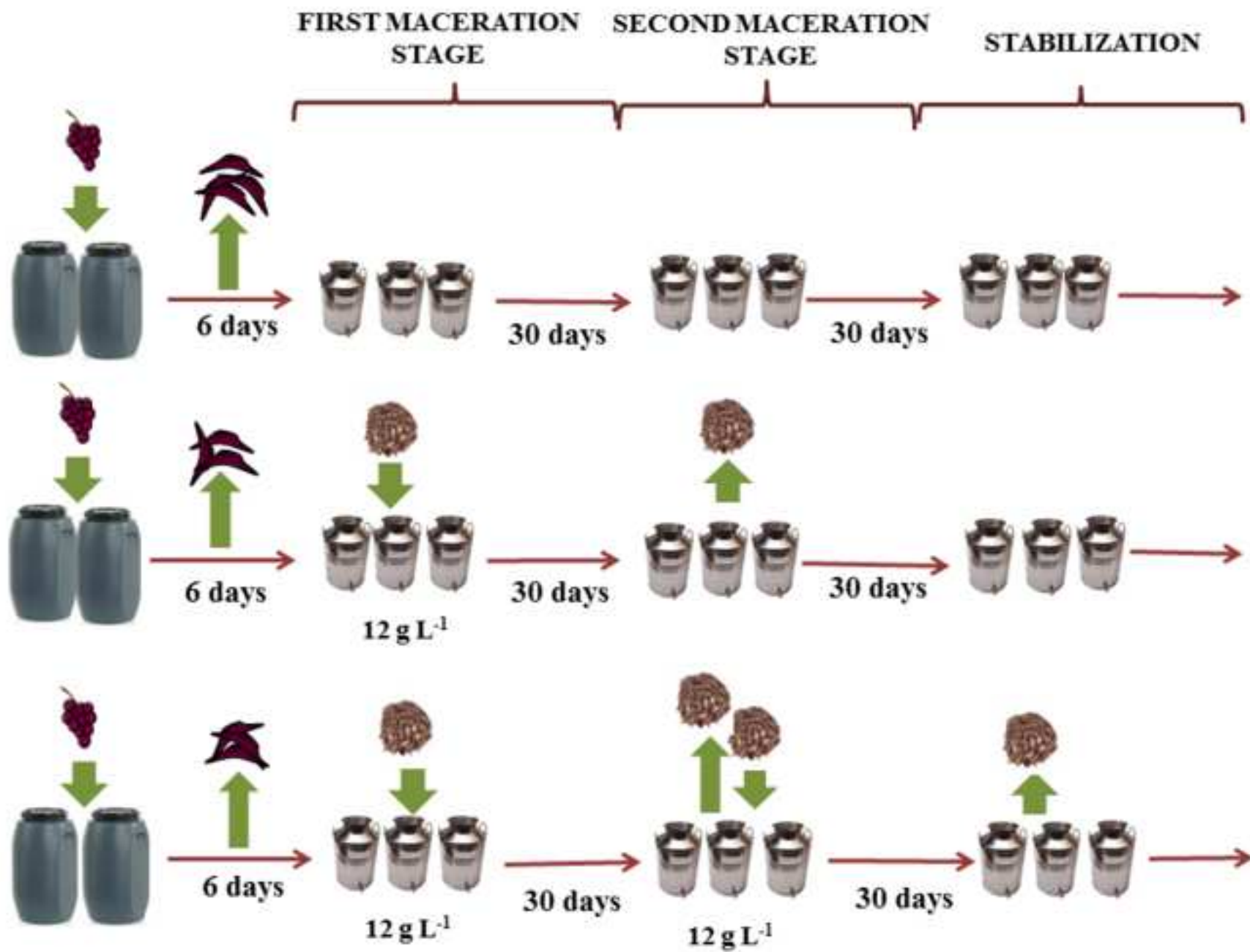
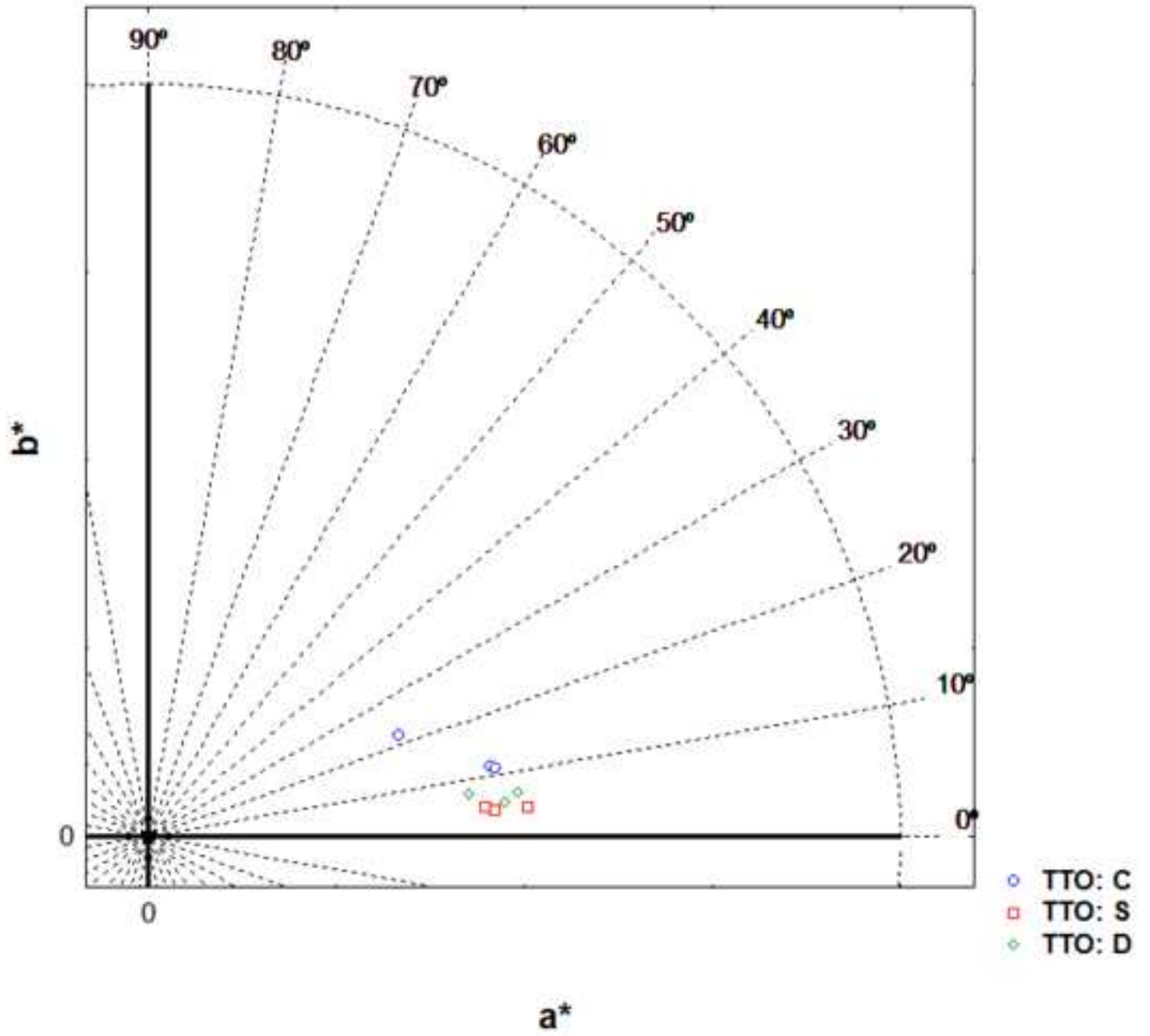


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

CIELAB (a*b*)-diagram



CONCLUSIONES GENERALES



CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se han utilizado con éxito distintas técnicas espectroscópicas para el estudio de la extractabilidad de compuestos fenólicos procedentes de uva y de subproductos de tonelería, utilizados como coadyuvantes de vinificación.

Las conclusiones más importantes son las siguientes:

PRIMERA: Los copigmentos procedentes de chips de madera tostada de roble pueden aumentar y estabilizar el color del vino sin interferir en el equilibrio de extracción de antocianos. Se ha probado que la adición de estos copigmentos no reduce la cantidad de antocianos extraídos a partir del hollejo de uva tinta durante la etapa de maceración.

SEGUNDA: El análisis de componentes principales de los datos espectrales permite reducir el número de muestras necesarias para la obtención de modelos de calibración manteniendo la heterogeneidad espectral existente en el set de muestras de partida. A partir de esta selección de muestras, pueden desarrollarse modelos válidos para la estimación de diferentes parámetros de interés en semillas y hollejos de uva, y en virutas de madera, con una reducción de la cantidad de recursos necesarios para ello, tanto desde el punto de vista experimental como computacional.

TERCERA: Se han desarrollado modelos que permiten estimar con éxito el contenido fenólico total y contenido flavanólico total en semillas de uva tinta a partir de análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano, identificándose las regiones alrededor de 1200 y 1400 nm como las de mayor peso en la predicción. Esta técnica presenta, además, un poder discriminatorio elevado para la clasificación de muestras de semilla de uva tinta según su nivel de extractabilidad fenólica, encontrándose mayores extractabilidades para las semillas de uva de variedad Syrah que para las de Tempranillo.

CUARTA: El análisis de imagen hiperespectral en la región del infrarrojo cercano y la aplicación de modelos de regresión múltiple permiten estimar con éxito el contenido extraíble de fenoles totales en viruta cruda de roble, obteniéndose contenidos extraíbles mayores para las virutas obtenidas tras un procesado de la madera en dirección longitudinal de las fibras que para aquellas generadas tras un procesado transversal. La aplicación de técnicas de imagen hiperespectral NIR permite realizar una selección rápida y objetiva de la viruta de roble más adecuada según las características deseadas para el vino.

QUINTA: En muestras de uva, los modelos desarrollados utilizando un espectrómetro NIR portátil miniaturizado, para estimar *in situ* el contenido extraíble de antocianos, flavanoles y fenoles totales, presentan errores que comprometen su aplicación con fines predictivos. De forma similar, los bajos porcentajes de clasificación correcta de las muestras según su nivel de contenido fenólico extraíble comprometen la utilidad de esta técnica con fines clasificatorios.

SEXTA: A partir del análisis espectral NIR portátil, es posible obtener modelos fiables para estimar el contenido extraíble de fenoles totales y elagitaninos en viruta cruda de roble, que confirman las ventajas del procesado de la madera en dirección longitudinal de las fibras en cuanto al nivel de contenido fenólico extraíble. Se han identificado las zonas alrededor de 1200 y 1400 nm del espectro como las de mayor influencia en la predicción de este parámetro. El desarrollo de modelos aplicables *in situ* permitirá una mayor versatilidad y eficiencia para la toma de decisiones en el proceso de vinificación sobre la adecuación y/o dosificación de este subproducto.

SÉPTIMA: La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y la espectroscopía Raman han probado ser técnicas efectivas y fiables para relacionar las características espectrales más importantes con el nivel de extractabilidad de fenoles totales en viruta cruda de roble. Estas técnicas, junto con la microscopía electrónica de barrido, confirman la influencia de la estructura y la morfología de la pared celular de la madera en la extractabilidad de compuestos fenólicos.

OCTAVA: Se ha confirmado que la adición post-fermentativa de viruta de madera cruda representa un procedimiento enológico útil para la elaboración de vinos tintos en clima cálido, ya que conduce a una mejora de la calidad y estabilidad cromática con respecto a la vinificación tradicional. Las diferencias de color, evaluadas por Colorimetría Triestímulo, demuestran que se obtienen vinos con mejores características cromáticas cuando el tiempo de maceración y la cantidad de viruta añadida son moderados.

GENERAL CONCLUSIONS

In this work, different spectroscopic techniques have been successfully used to study the extractability of phenolic compounds from grapes and cooperage by-products, used as processing aids.

The following main conclusions are drawn from the studies carried out:

FIRST: Copigments coming from toasted oak wood chips can improve and stabilize wine color without hampering the extraction equilibrium of anthocyanins compounds. It has been proven that the addition of these copigments do not reduce the amount of anthocyanins extracted from grape skins during the maceration stage.

SECOND: Calibration models can be obtained from a reduced number of samples by the use of principal component analysis. This reduction can be achieved without loss of spectral heterogeneity of the original sample set. The application of this methodology allows developing models for the screening of different parameters of interest in grapes (seeds and skins) and oak wood shavings, reducing the resources necessary for this, both from the computational and experimental point of view.

THIRD: Extractable content of total phenols and flavanols can be predicted in red grape seeds using near infrared hyperspectral imaging. The spectral regions around 1200 and 1400 nm have been identified as important regions for the phenolic screening. Moreover, this methodology allows sorting red grape seeds according to their extractability of phenolic compounds. The obtained results indicate higher extractability of phenolic compounds in Syrah than in Tempranillo seeds.

FOURTH: Near infrared hyperspectral imaging and modified partial least squares regression (MPLS) have been successfully used for the screening of extractable phenolic content in oak wood shavings. The extractable content of total phenols is higher in shavings generated by processes of the staves in the longitudinal direction of the fibers than in transversal ones. The application of NIR hyperspectral imaging techniques will allow a fast and objective selection of the most suitable oak shavings according to the characteristics desired for wine.

FIFTH: Portable NIR spectroscopy does not present enough accuracy for the “in vineyard” screening of extractable polyphenols (anthocyanins, flavanols and total phenols) in red grape skins. Similar to quantitative results, the different approaches carried out for the discriminations of samples according to their level of extractable compounds show unremarkable results.

SIXTH: Portable NIR spectroscopy allows developing reliable models to estimate the extractable content of total phenols and ellagitannins in oak wood shavings. This procedure confirms the advantages of wood processing in the longitudinal direction of the fibers in terms of the level of extractable phenolic content. The spectral regions around 1200 and 1400 nm have shown to have important contributions for the phenolic screening. Development of applicable models *in situ* will allow a greater versatility and efficiency for the decision-making in the winemaking process on the adequacy and/or dosage of these byproducts according to the requirements of the wine.

SEVENTH: Fourier transform infrared and Raman spectroscopy have proven to be effective and reliable tools to relate the more important spectral features to phenolic extractability levels in oak wood shavings. These techniques, together scanning electron microscopy, confirm the influence of the structure and/or morphology of the cell wall wood on phenolic compounds extractability.

EIGHTH: Post-fermentative addition of oak wood shavings is a useful oenological procedure to elaborate red wines in warm climates since it improves both phenolic composition and quality and stability of colour with respect to traditional vinification. Color differences, evaluated by Tristimulus Colorimetry, show that wines with better chromatic characteristics are obtained when the time of maceration and the amount of shavings added are moderate.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- Agarwal, U. P. (2014). 1064 nm FT-Raman spectroscopy for investigations of plant cell walls and other biomass materials. *Frontiers in Plant Science*, 5, 490.
- Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Gordon, M. H., y Pérez-Coello, M. S. (2011). A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry*, 128(4), 997-1002.
- Arnold, R. A., Noble, A. C., y Singleton, V. L. (1980). Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(3), 675-678.
- Asselin, C., y Delteil, D. (2003). Vinificaciones: principales operaciones unitarias comunes. En *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, (2ª ed. (pp.)). Madrid, España: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.
- Ayvaz, H., Sierra-Cadavid, A., Aykas, D. P., Mulqueeny, B., Sullivan, S., y Rodriguez-Saona, L. E. (2016). Monitoring multicomponent quality traits in tomato juice using portable mid-infrared (MIR) spectroscopy and multivariate analysis. *Food Control*, 66, 79-86.
- Baca-Bocanegra, B., Nogales-Bueno, J., Heredia, F. J., y Hernandez-Hierro, J. M. (2018). Estimation of Total Phenols, Flavanols and Extractability of Phenolic Compounds in Grape Seeds Using Vibrational Spectroscopy and Chemometric Tools. *Sensors* 18(8).
- Baca-Bocanegra, B., Nogales-Bueno, J., Hernandez-Hierro, J. M., y Heredia, F. J. (2018). Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage byproduct by near infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 244, 206-212.
- Baca-Bocanegra, B., Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F., González-Miret, M., Hernández-Hierro, J., y Heredia, F. (2016). Near infrared hyperspectral imaging: recent applications in the oenological and viticultural sectors. *NIR news*, 27(6), 14-18.
- Baiano, A., Terracone, C., Peri, G., y Romaniello, R. (2012). Application of hyperspectral imaging for prediction of physico-chemical and sensory characteristics of table grapes. *Computers and Electronics in Agriculture*, 87, 142-151.
- Balasundram, N., Sundram, K., y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Barbin, D. F., Elmasry, G., Sun, D. W., y Allen, P. (2013). Non-destructive determination of chemical composition in intact and minced pork using near-infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1162-1171.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., y Lister, S. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy*, 43(5), 772-777.

-
- Basri, K. N., Hussain, M. N., Bakar, J., Sharif, Z., Khir, M. F. A., y Zoolfakar, A. S. (2017). Classification and quantification of palm oil adulteration via portable NIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 335-342.
- Bautista-Ortín, A. B., Jiménez-Pascual, E., Busse-Valverde, N., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., y Gómez-Plaza, E. (2013). Effect of Wine Maceration Enzymes on the Extraction of Grape Seed Proanthocyanidins. *Food and Bioprocess Technology*, 6(8), 2207-2212.
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N., y Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 1-7.
- Blakey, R. J. (2016). Evaluation of avocado fruit maturity with a portable near-infrared spectrometer. *Postharvest Biology and Technology*, 121, 101-105.
- Bokobza, L. (1998). Near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6(1), 3-17.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wines. A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.
- Boulton, R. B. (1996). A method for the assessment of copigmentation in red wines. In *47 th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viculture, Reno, NV*.
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester, West Sussex, England: J. Wiley.
- Byrne, H. J., Ostrowska, M. K., Nawaz, H., Dorney, J., Meade, D. A., Bonnier, F., y Lyng, M. F. (2014). Vibrational Spectroscopy: Disease Diagnostics and Beyond. En *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine*, (pp. 355-399). Dordrecht, Netherlands: Springer Netherlands.
- Byrne, H. J., Sockalingum, G. D., y Stone, N. (2011). Chapter 4 Raman Microscopy: Complement or Competitor? En *Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy: A Practical Approach*, (pp. 105-143). Karlsruhe, Germany: The Royal Society of Chemistry.
- Cadot, Y., Minana-Castello, M. T., y Chevalier, M. (2006). Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9206-9215.
- Caldeira, I., Climaco, M. C., de Sousa, R. B., y Belchior, A. P. (2006). Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 76(2), 202-211.
- Canals, R., Llaudy, M. C., Valls, J., Canals, J. M., y Zamora, F. (2005). Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 53, 4019-4025.

-
- Canas, S., Leandro, M. C., Spranger, M. I., y Belchior, A. P. (2000). Influence of botanical species and geographical origin on the content of low molecular weight phenolic compounds of woods used in Portuguese cooperage. *Holzforschung*, 54(3), 255-261.
- Cano-Lopez, M., Lopez-Roca, J. M., Pardo-Minguez, F., y Gomez Plaza, E. (2010). Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour. *Food Chemistry*, 119(1), 191-195.
- Carbonneau, A., Champagnol, F., Deloire, A., y Sevilla, F. (2003). Vendimia y calidad de la uva. En *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, (2ª Edición ed. (pp.). Madrid, España: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.
- Casassa, L. F., Bolcato, E. A., y Sari, S. E. (2015). Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. *Food Chemistry*, 174, 110-118.
- CE_1507/2006. (2006). Reglamento (CE) No 1507/2006 de la comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 280, 9-11.
- Cejudo-Bastante, M. J., Gordillo, B., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., Gonzalez-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2014). Effect of the time of cold maceration on the evolution of phenolic compounds and colour of Syrah wines elaborated in warm climate. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(8), 1886-1892.
- Cejudo-Bastante, M. J., Rivero-Granados, F. J., y Heredia, F. J. (2017). Improving the color and aging aptitude of Syrah wines in warm climate by wood-grape mix maceration. *European Food Research and Technology*, 243(4), 575-582.
- Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Morgado, B., Jara-Palacios, M. J., Rivas-Gonzalo, J. C., Parrado, J., y Heredia, F. J. (2016). Pre-fermentative addition of an enzymatic grape seed hydrolysate in warm climate winemaking. Effect on the differential colorimetry, copigmentation and polyphenolic profiles. *Food Chemistry*, 209, 348-357.
- CIE. (2004). Technical Report: Colorimetry (3rd ed.). Vienna, Austria: Commission Internationale de l'Eclairage Central Bureau.
- Colares, C. J. G., Pastore, T. C. M., Coradin, V. T. R., Camargos, J. A. A., Moreira, A. C. O., Rubim, J. C., y Braga, J. W. B. (2015). Exploratory Analysis of the Distribution of Lignin and Cellulose in Woods by Raman Imaging and Chemometrics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(6), 1297-1305.
- Colares, C. J. G., Pastore, T. C. M., Coradin, V. T. R., Marques, L. F., Moreira, A. C. O., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., y Braga, J. W. B. (2016). Near infrared hyperspectral imaging and MCR-ALS applied for mapping chemical composition of the wood specie *Swietenia Macrophylla* King (Mahogany) at microscopic level. *Microchemical Journal*, 124, 356-363.

-
- Cozzolino, D., Kwiatkowski, M. J., Parker, M., Cynkar, W. U., Damberg, R. G., Gishen, M., y Herderich, M. J. (2004). Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 73-80.
- Crozier, A., Clifford, M. N., y Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford, England: Blackwell Publishing.
- Chassaing, S., Lefeuvre, D., Jacquet, R., Jourdes, M., Ducasse, L., Galland, S., Grelard, A., Saucier, C., Teissedre, P.-L., Dangles, O., y Quideau, S. (2010). Physicochemical studies of new anthocyano-ellagitannin hybrid pigments: about the origin of the influence of oak C-glycosidic ellagitannins on wine color. *European Journal of Organic Chemistry*, 1, 55-63.
- Chatonnet, P., y Dubourdieu, D. (1998). Comparative study of the characteristics of American white oak (*Quercus alba*) and European oak (*Quercus petraea* and *Q-robur*) for production of barrels used in barrel aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(1), 79-85.
- Chen, S., Zhang, F., Ning, J., Liu, X., Zhang, Z., y Yang, S. (2015). Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 172, 788-793.
- Cheyrier, V., Moutounet, M., y Sarni-Machado, P. (2003). Los compuestos fenólicos. En *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, (pp. 114-136). Madrid, España: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.
- Christen, H. R., y Beltrán, J. (1977). *Fundamentos de la química general e inorgánica*. Barcelona, España: Reverté.
- De la Roza-Delgado, B., Garrido-Varo, A., Soldado, A., Gonzalez Arrojo, A., Cuevas Valdes, M., Maroto, F., y Perez-Marin, D. (2017). Matching portable NIRS instruments for in situ monitoring indicators of milk composition. *Food Control*, 76, 74-81.
- De Rosso, M., Panighel, A., Vedova, A. D., Stella, L., y Flamini, R. (2009). Changes in Chemical Composition of a Red Wine Aged in Acacia, Cherry, Chestnut, Mulberry, and Oak Wood Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1915-1920.
- Deane, J. M. (1992). Chapter 5 Data Reduction Using Principal Components Analysis. 9, 125-177.
- Del Álamo Sanza, M., y Nevares Domínguez, I. (2006). Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 255-263.
- Del Alamo Sanza, M., Nevares Domínguez, I., Cárcel Cárcel, L. M., y Navas Gracia, L. (2004). Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 229-237.
- Escribano-Bailon, M. T., y Santos-Buelga, C. (2012). Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 715-723.

-
- Faix, O. (1992). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. En *Methods in Lignin Chemistry*, (pp. 83-109). Berlin: Springer
- Fernández De Simón, B., Cadahía, E., Conde, E., y García-Vallejo, M. C. (1999). Ellagitannins in woods of Spanish, French and American oaks. *Holzforschung*, 53(2), 147-150.
- Fernández de Simón, B., Cadahía, E., del Álamo, M., y Nevares, I. (2010). Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 211-220.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2010). Feasibility study on the use of near infrared spectroscopy to determine flavanols in grape seeds. *Talanta*, 82(5), 1778-1783.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2011). Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 847-853.
- Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J. M., Moutounet, M., y Cheynier, V. (2006). Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7331-7338.
- Frangipane, M. T., Santis, D. D., y Ceccarelli, A. (2007). Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chemistry*, 103(1), 46-54.
- García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., y Alcalde-Eon, C. (2010). Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 171-176.
- García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., y Alcalde-Eon, C. (2012). Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1373-1379.
- García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 134-142.
- García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 134-142.
- Geladi, P., Macdougall, D., y Martens, H. (1985). Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy*, 39(3), 491-500.
- Giordanengo, T., Charpentier, J. P., Boizot, N., Roussel, S., Roger, J. M., Chaix, G., Robin, C., y Mourey, N. (2009). Oakscan: procédé de mesure rapide et non destructif des polyphénols du bois de chêne de tonnellerie. *Revue française d'Oenologie*, 10-15.

-
- Glabasnia, A., y Hofmann, T. (2006). Sensory-Directed Identification of Taste-Active Ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and Quantitative Analysis in Bourbon Whiskey and Oak-Matured Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3380-3390.
- Goehner, R. P. (1978). Background subtract subroutine for spectral data. *Analytical Chemistry*, 50(8), 1223-1225.
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M. T., Heredia, F. J., y Santos-Buelga, C. (2006). Influence of Different Phenolic Copigments on the Color of Malvidin 3-Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5422-5429.
- Gómez-Míguez, M., González-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2007). Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 271-278.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., y Santos-Buelga, C. (2009). Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry*, 114(2), 649-656.
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., y Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 283-289.
- Gonzalez-Neves, G., Favre, G., Gil, G., Ferrer, M., y Charamelo, D. (2015). Effect of cold pre-fermentative maceration on the color and composition of young red wines cv. Tannat. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52(6), 3449-3457.
- Gonzalez-Neves, G., Favre, G., Piccardo, D., y Gil, G. (2016). Anthocyanin profile of young red wines of Tannat, Syrah and Merlot made using maceration enzymes and cold soak. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 260-267.
- Gordillo, Rodríguez-Pulido, F. J., Mateus, N., Escudero-Gilete, M. L., Gonzalez-Miret, M. L., Heredia, F. J., y de Freitas, V. (2012). Application of LC-MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region. *Analytica Chimica Acta*, 732, 162-171.
- Gordillo, B., Baca-Bocanegra, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Lourdes Gonzalez-Miret, M., Garcia Estevez, I., Quijada-Morin, N., Heredia, F. J., y Teresa Escribano-Bailon, M. (2016). Optimisation of an oak chips-grape mix maceration process. Influence of chip dose and maceration time. *Food Chemistry*, 206, 249-259.
- Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Pulido, F. J., Gonzalez-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2013). Application of the differential colorimetry and polyphenolic profile to the evaluation of the chromatic quality of Tempranillo red wines elaborated in warm climate.

-
- Influence of the presence of oak wood chips during fermentation. *Food Chemistry*, 141(3), 2184-2190.
- Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez-Pulido, F. J., Jara-Palacios, M. J., Ramírez-Pérez, P., González-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2014). Impact of adding white pomace to red grapes on the phenolic composition and color stability of Syrah wines from a warm climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2663-2671.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Quijada-Morin, N., Rivas-Gonzalo, J. C., García-Estevez, I., Heredia, F. J., y Escribano-Bailon, M. T. (2015). Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin-flavonol-flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7645-7653.
- Guchu, E., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., González-Viñas, M. A., y Ibáñez, M. D. C. (2006). Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chips. *Food Chemistry*, 99(2), 350-359.
- Harbertson, J. F., Parpinello, G. P., Heymann, H., y Downey, M. O. (2012). Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry*, 131(3), 999-1008.
- Heredia, F. J., Álvarez, C., González-Miret, M. L., y Ramírez, A. (2004). Cromalab.
- Heredia, F. J., Escudero-Gilete, M. L., Hernanz, D., Gordillo, B., Melendez-Martinez, A. J., Vicario, I. M., y Gonzalez-Miret, M. L. (2010). Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chemistry*, 118(2), 377-383.
- Hernández-Hierro, J. M., Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F. J., y Heredia, F. J. (2013). Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9804-9809.
- Hernandez-Hierro, J. M., Quijada-Morin, N., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailon, M. T. (2012). Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 26-32.
- Hernandez-Jimenez, A., Gomez-Plaza, E., Martinez-Cutillas, A., y Kennedy, J. A. (2009). Grape Skin and Seed Proanthocyanidins from Monastrell x Syrah Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10798-10803.
- Hernández-Orte, P., Franco, E., Huerta, C. G., García, J. M., Cabellos, M., Suberviola, J., Orriols, I., y Cacho, J. (2014). Criteria to discriminate between wines aged in oak barrels and macerated with oak fragments. *Food Research International*, 57, 234-241.

-
- Hidalgo Togores, J. (2010). *Tratado de enología: tomo I (2a. ed.)*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Hong, V., y Wrolstad, R. E. (1990a). Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by hplc photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 698-708.
- Hong, V., y Wrolstad, R. E. (1990b). Use of hplc separation photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 708-715.
- Hufnagel, J. C., y Hofmann, T. (2008a). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1376-1386.
- Hufnagel, J. C., y Hofmann, T. (2008b). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9190-9199.
- Hüskuldsson, A. (1996). *Prediction Methods in Science and Technology*. Copenhagen, Denmark: Thor Publishing.
- IBM® (2015). SPSS® Statistics Version 22.0.
- Infrasoft International LLC (2000). WinISI II Version 1.50.
- Jara-Palacios, M., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M., y Heredia, F. (2016). The Use of Grape Seed Byproducts Rich in Flavonoids to Improve the Antioxidant Potential of Red Wines. *Molecules*, 21(11), 1526.
- Jason, S. L., y Emily, A. S. (2012). Characterization of Woody and Herbaceous Biomasses Lignin Composition with 1064 nm Dispersive Multichannel Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 66(8), 903-910.
- Jourdes, M., Michel, J., Saucier, C., Quideau, S., y Teissedre, P. L. (2011). Identification, amounts, and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1531-1539.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., y Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4360-4367.
- Karim, M., Daryaei, M. G., Torkaman, J., Oladi, R., Ghanbary, M. A. T., y Bari, E. (2016). In vivo investigation of chemical alteration in oak wood decayed by *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 127-132.
- Kim, I., Kim, M. S., Chen, Y. R., y Kong, s. g. (2004). Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy. *Byosystems Engineering*, 105.

-
- Kumaravelu, C., Gopal, A., y Ieee. (2015). A Review on the applications of Near-Infrared Spectrometer and Chemometrics for the Agro-Food Processing Industries. In *Proceedings 2015 Ieee International Conference on Technological Innovations in Ict for Agriculture and Rural Development Tiar 2015*, (pp. 8-12).
- Larsen, K. L., y Barsberg, S. (2010). Theoretical and Raman Spectroscopic Studies of Phenolic Lignin Model Monomers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(23), 8009-8021.
- Lestander, T., Geladi, P., Larsson, S., y Thyrel, M. (2012). Near infrared image analysis for online identification and separation of wood chips with elevated levels of extractives. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20(5), 591.
- Lieber, C. A., y Mahadevan-Jansen, A. (2003). Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Applied Spectroscopy*, 57(11), 1363-1367.
- Lopes-da-Silva, F., de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J., y Santos-Buelga, C. (2002). Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology*, 214(3), 248-253.
- MacQueen, J. (1967). Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Volume 1: Statistics*, (pp. 281-297). Berkeley, California: University of California Press.
- Malheiro, A. C., Santos, J. A., Fraga, H., y Pinto, J. G. (2010). Climate change scenarios applied to viticultural zoning in Europe. *Climate Research*, 43(3), 163-177.
- Markham, K. R. (1982). Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy. En *Techniques of Flavonoid Identification*, (pp.). Nueva York, Estados Unidos: Academic Press.
- Masson, G., Moutounet, M., y Puech, J. L. (1995). Ellagitannin content of oak wood as a function of species and of sampling position in the tree. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 262-268.
- Mazet, V., Carteret, C., Brie, D., Idier, J., y Humbert, B. (2005). Background removal from spectra by designing and minimising a non-quadratic cost function. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 76(2), 121-133.
- Michel, J., Jourdes, M., Le Floch, A., Giordanengo, T., Mourey, N., y Teissedre, P. L. (2013). Influence of wood barrels classified by NIRS on the ellagitannin content/composition and on the organoleptic properties of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 11109-11118.
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844-1855.
- Mori, K., Sugaya, S., y Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*, 105(3), 319-330.

-
- Mosedale, J. R., Puech, J. L., y Feuillat, F. (1999). The influence on wine flavor of the oak species and natural variation of heartwood components. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 503-512.
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Jara-Palacios, M. J., Hernandez-Hierro, J. M., y Heredia, F. J. (2017). Evaluation of the influence of white grape seed extracts as copigment sources on the anthocyanin extraction from grape skins previously classified by near infrared hyperspectral tools. *Food Chemistry*, 221, 1685-1690.
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Heredia, F. J., y Hernández-Hierro, J. M. (2015). Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins. *Food Chemistry*, 172, 559-564.
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Hernandez-Hierro, J. M., Byrne, H. J., y Heredia, F. J. (2017). Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 232, 602-609.
- Nogales-Bueno, J., Hernández-Hierro, J. M., Rodríguez-Pulido, F. J., y Heredia, F. J. (2014). Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach. *Food Chemistry*, 152, 586-591.
- Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F. J., Baca-Bocanegra, B., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., y Hernández-Hierro, J. M. (2016). Hyperspectral Imaging - A Novel Green Chemistry Technology for the Oenological and Viticultural Sectors. En *Agricultural research updates*, (pp. 45-56).
- OENO_3/2005, y OENO_430/2010. (2013). *Pieces of oak wood*. Paris, France: International oenological codex oiv.
- Ortega-Heras, M., Perez-Magarino, S., y Gonzalez-Sanjose, M. L. (2012). Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencia red wine. *Lwt-Food Science and Technology*, 48(1), 1-8.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., y Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 26-32.
- Pandey, K. K., y Theagarajan, K. S. (1997). Analysis of wood surfaces and ground wood by diffuse reflectance (DRIFT) and photoacoustic (PAS) Fourier transform infrared spectroscopic techniques. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 55(6), 383-390.
- Perez-Lamela, C., Garcia-Falcon, M. S., Simal-Gandara, J., y Orriols-Fernandez, I. (2007). Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry*, 101(2), 601-606.

-
- Perez-Marin, D., Paz, P., Guerrero, J.-E., Garrido-Varo, A., y Sanchez, M.-T. (2010). Miniature handheld NIR sensor for the on-site non-destructive assessment of post-harvest quality and refrigerated storage behavior in plums. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 294-302.
- Pérez-Marín, D., Sánchez, M.-T., Paz, P., Soriano, M.-A., Guerrero, J.-E., y Garrido-Varo, A. (2009). Non-destructive determination of quality parameters in nectarines during on-tree ripening and postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 180-188.
- Pinelo, M., Arnous, A., y Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.
- Prado, N., Fernandez-Ibanez, V., Gonzalez, P., y Soldado, A. (2011). On-Site NIR Spectroscopy to Control the Shelf Life of Pork Meat. *Food Analytical Methods*, 4(4), 582-589.
- Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, M., Bertrand, D., y Cheyner, V. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 126-136.
- Prida, A., y Puech, J.-L. (2006). Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8115-8126.
- Puech, J. L., Feuillat, F., y Mosedale, J. R. (1999). The tannins of oak heartwood: Structure, properties, and their influence on wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 469-478.
- Quideau, S., Jourdes, M., Lefeuvre, D., Montaudon, D., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P., y Pourquier, P. (2005). The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chemistry*, 11(22), 6503-6513.
- Ramis-Ramos, G., y García-Álvarez-Coque, M. C. (1999). *Quimiometría*. Madrid, España: Síntesis.
- Razungles, A., Blouin, J., Boulet, J. C., Escudier, J. L., Feuillat, M., Flanzky, C., y Peyron, D. (2003). Vinificación en tinto. En *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, (2ª Edición ed. (pp.)). Madrid (España): AMV Ediciones y Mundi-Prensa.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., y Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*. West Sussex, England: Wiley & Sons.
- Ristic, R., y Iland, P. G. (2005). Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(1), 43-58.
- Rivero, F. J., Gordillo, B., Jara-Palacios, M. J., Gonzalez-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2017). Effect of addition of overripe seeds from white grape by-products during red wine

-
- fermentation on wine colour and phenolic composition. *Lwt-Food Science and Technology*, 84, 544-550.
- Rodríguez-Pulido, F. J., Barbin, D. F., Sun, D.-W., Gordillo, B., González-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2013). Grape seed characterization by NIR hyperspectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 76, 74-82.
- Rodríguez-Pulido, F. J., Hernández-Hierro, J. M., Nogales-Bueno, J., Gordillo, B., Gonzalez-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2014). A novel method for evaluating flavanols in grape seeds by near infrared hyperspectral imaging. *Talanta*, 122, 145-150.
- Rogalski, A. (2003). Infrared detectors: status and trends. *Progress in Quantum Electronics*, 27(2-3), 59-210.
- Saranwong, S., Sornsrivichai, J., y Kawano, S. (2003). On-tree evaluation of harvesting quality of mango fruit using a hand-held NIR instrument. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 11(4), 283-293.
- Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y., y Quideau, S. (2006). Extraction, detection, and quantification of flavano-ellagitannins and ethylvescalagin in a Bordeaux red wine aged in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7349-7354.
- Sauvageot, F., y Feuillat, F. (1999). The influence of oak wood (*Quercus robur* L., *Q-petraea* Liebl.) on the flavor of Burgundy Pinot noir. An examination of variation among individual trees. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 447-455.
- Scalbert, A., Monties, B., y Janin, G. (1989). Tannins in wood - comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1324-1329.
- Schultz, T. P., y Glasser, W. G. (1986). Quantitative structural analysis of lignin by diffuse reflectance Fourier transform spectrometry. *Holzforschung*, 40(SUPPL.), 37-44.
- Shenk, J. S., y Westerhaus, M. O. (1995). *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*. Silver Spring, Maryland: NIRSystems.
- Siesler, H. W., Ozaky, Y., Kawata, S., y Heise, H. M. (2002). *Near infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Singleton, V. L. (1995). Maturation of wines and spirits - comparisons, facts, and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 98-115.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*(16), 144-158.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., y Crouch, S. R. (2009). *Principios de análisis instrumental* (6ª ed.). España.
- Sogorb Sánchez, M. Á. (2006). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos: aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.

-
- Sorak, D., Herberholz, L., Iwascek, S., Altinpinar, S., Pfeifer, F., y Siesler, H. W. (2012). New Developments and Applications of Handheld Raman, Mid-Infrared, and Near-Infrared Spectrometers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 47(2), 83-115.
- Soto Vazquez, E., Rio Segade, S., y Orriols Fernandez, I. (2010). Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *European Food Research and Technology*, 231(5), 789-802.
- Spectral Imaging Ltd (2010). SpectralDAQ Versión 3.62.
- StatSoft Inc (2007). STATISTICA (data analysis software system) Version 8.0.
- Sun, D. W. (2010). *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*. San Diego, California: Elsevier Science & Technology.
- Teissedre, P. L., Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Peleg, H., y German, J. B. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(1), 55-61.
- Teixeira dos Santos, C. A., Lopo, M., Pascoa, R. N. M. J., y Lopes, J. A. (2013). A Review on the Applications of Portable Near-Infrared Spectrometers in the Agro-Food Industry. *Applied Spectroscopy*, 67(11), 1215-1233.
- The MathWorks (2012). Matlab® Versión R2012b.
- Thumm, A., Riddell, M., Nanayakkara, B., Harrington, J., y Meder, R. (2010). Near infrared hyperspectral imaging applied to mapping chemical composition in wood samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 18(6), 507-515.
- Torchio, F., Cagnasso, E., Gerbi, V., y Rolle, L. (2010). Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 183-189.
- Trouillas, P., Sancho-Garcia, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., y Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Review Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937-4982.
- Vandeginste, B. G. M., Massart, D. L., y Buydens, L. M. C. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics* (Vol. 20). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Viriot, C., Scalbert, A., Dupenhoat, C., y Moutounet, M. (1994). Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut dimerization and hydrolysis during wood aging. *Phytochemistry*, 36(5), 1253-1260.
- Vivas, N. (1997). *Recherches sur la qualité de chêne français de tonnellerie (Q. petraea Liebl., Q. robur L.) et sur les mécanismes d'oxidoréduction des vins rouges au cours de leur élevage en barriques*. Unpublished Thesis, Université Bordeaux.
- Vivas, N. (2002). *Manuel de Tonnellerie a l'usage des utilisateurs de futailles* (2ème ed.). France.
- Vivas, N., y Glories, Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 103-107.

-
- Vivas, N., Glories, Y., Lagune, L., Saucier, C., y Augustin, M. (1994). Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamaldéhyde. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 28, 319-336.
- Waterhouse, A. L. (2002). *Wine phenolics*. New York, New York: The New York Academy of Sciences.
- Wiedemair, V., De Biasio, M., Leitner, R., Balthasar, D., y Huck, C. W. (2018). Application of Design of Experiment for Detection of Meat Fraud with a Portable Near-Infrared Spectrometer. *Current Analytical Chemistry*, 14(1), 58-67.
- Yoon, S. C., Lawrence, K. C., Smith, D. P., Park, B., y Windham, W. R. (2008). Bone fragment detection in chicken breast fillets using transmittance image enhancement. *Transactions of the ASABE*, 51(1), 331-339.
- Zahri, S., Moubarik, A., Charrier, F., Chaix, G., Bailleres, H., Nepveu, G., y Charrier, B. (2008). Quantitative assessment of total phenol contents of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) by diffuse reflectance NIR spectroscopy on solid wood surfaces. *Holzforschung*, 62(6), 679-687.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Madrid: Mundi Prensa.
- Zouid, I., Siret, R., Jourjon, F., Mehinagic, E., y Rolle, L. (2013). Impact of grapes heterogeneity according to sugar level on both physical and mechanical properties and their anthocyanins extractability at harvest. *Journal of Texture Studies*, 44(2), 95-103.

